VOLUMEN 7 OCTUBRE-DICIEMBRE 1954 NUM. 4

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
28 MAR 1955

SUMARIO

Página

Dr. Antonio Ruiz Falcó (†) 259

En memoria 261

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

Estudios sobre purificación y desantigenización enzimáticas de sueros y plasmas antitóxicos. I., por **F. Cordón** y **A. Martínez** 265

Estudios sobre purificación y desantigenización enzimáticas de sueros y plasmas antitóxicos. II., por **F. Cordón** y **A. Martínez** 291

Fijaciones de complemento entre sueros de caballos con síndrome paraplégico y antígenos de encefalitis Este y Oeste americanas, por **Eduardo Gallardo Martínez** y **Angel P. García Gancedo** 307

BIBLIOGRAFIA

Indice de artículos de revistas 315

SE SUPLICA EL CAMBIO
ON PRIE L'ECHANGE
AUSTAUSCH ERWUNSCHT
EXCHANGE DESIRED

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
SERRANO, 113 ó 152 - MADRID - (ESPAÑA)

Número suelto: 22 pesetas. Suscripción anual (4 números): 80 pesetas.

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

INDICE
del Volumen 7 (1954)

Redacción: Serrano, 113 ó 152
MADRID

SUMARIO DEL NUM. 1

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

La acción de los antibióticos sobre los fagus, por **José Vidal Munné** 3

Plantas, microbios y materia orgánica. I. La rizosfera, por **F. C. Gerretsen** 31

La naturaleza de los simbiotes intracelulares de Blatella germánica, por **Julio Pérez Silva** 51

INFORMACION

VI Congreso Internacional de Microbiología 61

Actas de la Sociedad 67

BIBLIOGRAFIA

Indice de artículos de revistas 69

SUMARIO DEL NUM. 2

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

Contribución al estudio de las propiedades bioquímicas y sensibilidad a los antibióticos del Diplo-estreptococcus suis, por **Santos Ovejero, Miguel Díez y R. Pascual** 85

Extracción y observación al microscopio electrónico de las inclusiones intracelulares cristalinas producidas por el virus «Mosaico del tabaco», por **Miguel Rubio Huertos.** 97

Una nueva especie de Endomycopsis: E. balearica nov sp. aislada de concentrado de tanino de encina, por **Arnaldo Socías Amorós, Carlos Ramírez Gómez y Rafael Genestar Serra** 107

Una nueva especie de Debaryomices: el Debaryomices Toletanus nov sp., por **Arnaldo Socías Amorós, Carlos Ramírez Gómez y Fernando Peláez Campomanes** 111

Sobre la higienización de la leche por radiofrecuencia, por **Vicente M. Piqueras** 115

Luodiagnóstico por la reacción de fijación del complemento con suspensión de treponemas de Reiter, por **F. Moreno de Vega** 125

Nueva aportación al estudio de la determinación biológica de los efectos desnaturalizantes de la acción proteásica sobre los sueros antitóxicos, por **F. Moreno de Vega** ... 135

Presencia de especies de Trichosporon en orujos de oliva, por **O. Verona** 175

INFORMACION

Renovación de Directiva 181

Nuevo socio de honor 181

Actas de la Sociedad 182

SUMARIO DEL NUM. 3

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

Cultivo «in vitro» de simbiotes intracelulares de insectos, por **Julio Pérez Silva** 187

INFORMACION

Actas de la Sociedad 255

SUMARIO DEL NUM. 4

Dr. Antonio Ruiz Falcó (†) 259

En memoria 261

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

Estudios sobre purificación y desantigenización enzimáticas de sueros y plasmas antitóxicos. I., por **F. Cordón** y **A. Martínez** 265

Estudios sobre purificación y desantigenización enzimáticas de sueros y plasmas antitóxicos. II., por **F. Cordón** y **A. Martínez** 291

Fijaciones de complemento entre sueros de caballos con síndrome paraplégico y antígenos de encefalitis Este y Oeste americanas, por **Eduardo Gallardo Martínez** y **Angel P. García Gancedo** 307

BIBLIOGRAFIA

Indice de artículos de revistas 315

VOLUMEN 7 OCTUBRE-DICIEMBRE 1954 NUM. 4

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

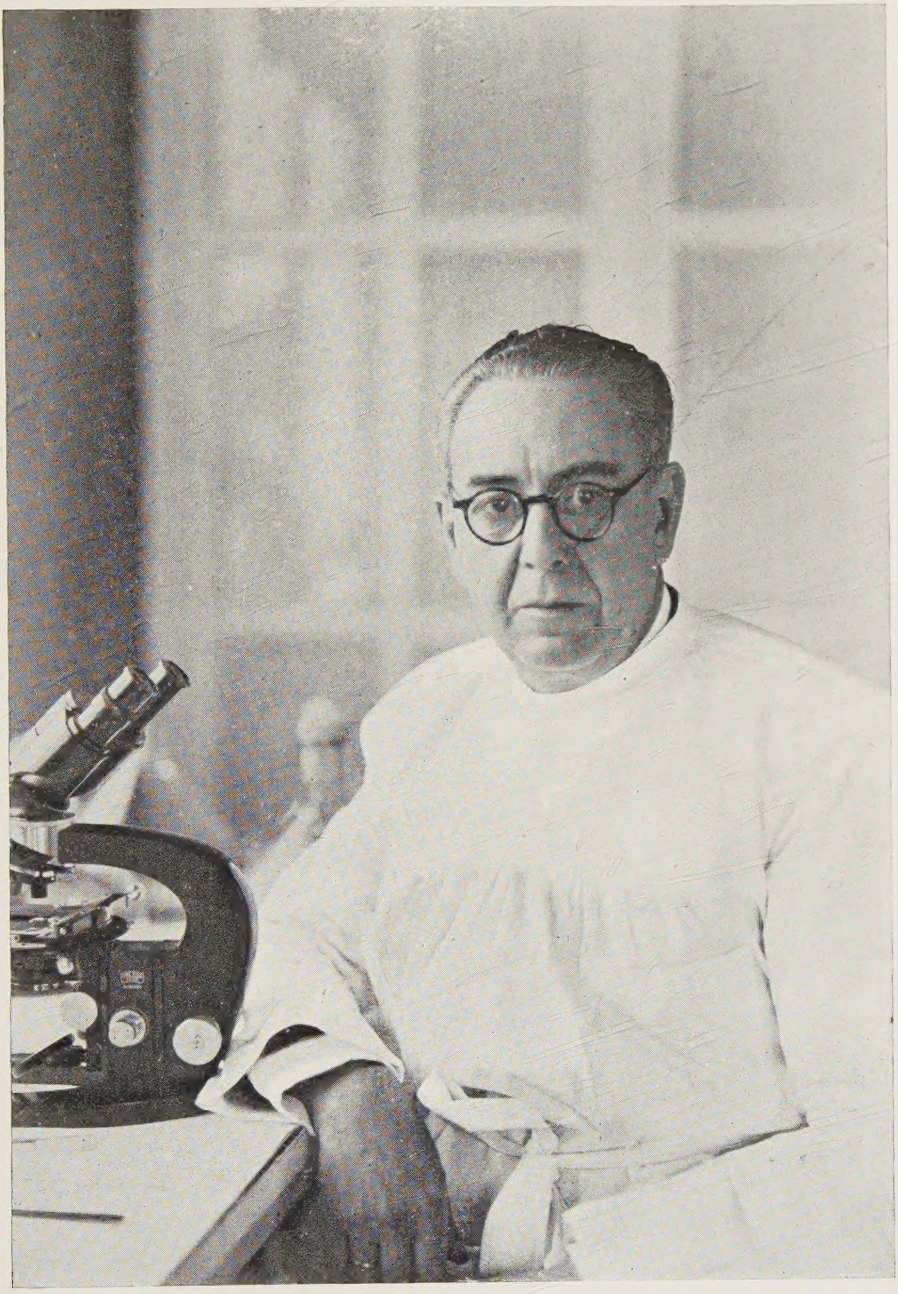
CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. don Arnaldo Socías Amorós, Director del Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología, del C. S. I. C.

Prof. Dr. don Lorenzo Vilas López, Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. don Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Gráficas **TEJARIO, S. A.** Pza. del Biombo, 4.-Tel. 22 12 88-Madrid



Dr. Antonio Ruiz Falcó
(11-I-1887 — 16-X-1954)

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/international-microbiology_october-december-1954_7_4

EN MEMORIA

Un terrible accidente de automóvil nos ha arrebatado al que desde febrero de 1951 era Presidente de nuestra Sociedad de Microbiólogos, don Antonio Ruiz Falcó. Representa la desaparición del verdadero maestro de la Bacteriología Médica en nuestra Patria.

Licenciado en San Carlos con la promoción gloriosa de 1909, una vocación ya decidida le llevó a Alemania; durante los dos años siguientes participó en los cursos del Real Instituto Prusiano de Berlín sobre Bacteriología e Higiene, con demostraciones de los procedimientos microfotográficos, y especialmente de la lucha contra las epidemias indígenas y tropicales, así como sobre las doctrinas de la inmunidad y la curación específica de las enfermedades infecciosas, en el curso del Hospital R. Virchow sobre enfermedades infecciosas y tuberculosis, dirigido por el profesor Yochmann, y en el de Química y Microscopia clínica del Instituto de Diagnóstico Médico de Berlín.

A su regreso introdujo sus estudios de Bacteriología en el Instituto Alfonso XIII, donde colaboró desde 1.º de julio de 1912, encargándose de la enseñanza en el curso de ampliación de estudios sanitarios y en el de opositores a las plazas de Sanidad Exterior. En 1917 pasó a dirigir la Sección de Epidemiología del Instituto, de la que en 1919 fué nombrado Jefe por oposición. Fué organizador de esos estudios y enseñanzas en el Centro y tomó parte en todos sus cursos. En 1928 pasó a ser Subdirector del Instituto Alfonso XIII.

Como tal visitó, invitado por la Fundación Rockefeller, las Instituciones de Higiene de Copenhague, Berlín, Varsovia, Praga, Budapest y Zagreb, con objeto de informarse de sus métodos de enseñanza con vistas a la formación de los sanitarios españoles.

Al servicio de la sanidad pública su actividad fué grande. Así ya en 1913 fué comisionado para trasladarse primero a las Islas Canarias y más tarde a Larache y Alcazarquivir, con motivo de la peste bubónica;

en 1914 lo fué a Vigo por la epidemia de fiebre tifoidea; en 1917, en unión del Doctor J. Blanco, por la de meningococcia, a Canet lo Roig, cuyo Ayuntamiento dió sus nombres a una de las calles de la localidad «en pago al celo, actividad y laboriosidad desplegados en su lucha contra la epidemia»; en 1918 fué comisionado también a la frontera de Irún, y más tarde a París, con motivo de la epidemia gripal y a fin de estudiar su etiología; en 1919 a Pontevedra para combatir una epidemia de disentería.

En los Anales del Instituto Alfonso XIII publicó los trabajos realizados con ocasión de estas comisiones de servicio. Escribió la sección de Bacteriología de las infecciones en el Tratado de Hernando y Marañón. También la conocida monografía «Reacciones serológicas de aglutinación» y otros trabajos de bacteriología.

Amaba el trabajo con franqueza porque era verdad su deseo de perfeccionamiento. Sufrió de infecciones contraídas en sus estudios y fué abnegado ante el dolor ajeno, como ya sucedió, sin límites, cuando su colaborador, M. R. de Partearroyo, resultó víctima de un contagio de laboratorio, según consta en acta del Instituto.

Como Maestro modeló, con singular arte y sinceridad siempre reconocida, a cuantos se interesaron por sus conocimientos. Además tuvo para todos sus alumnos la generosa amistad que desde el primer día profesaba a quienes trató. Bajo su dirección fueron formándose en el Instituto Alfonso XIII las sucesivas promociones de médicos de Sanidad Nacional en las disciplinas de Bacteriología, Serología e Inmunología, las que más tarde tuvo también a su cargo en la Escuela Nacional de Sanidad. Además formó parte de muchos tribunales juzgadores, como técnico calificado de Bacteriología.

Fué llamado a colaborar en las enseñanzas de la Facultad de Medicina en 1927 para explicar un curso monográfico anual de Bacteriología médica, y en 1930 fué nombrado, previo concurso, Profesor Auxiliar temporal de Microbiología Médica, cátedra de nueva creación. Como Profesor encargado del curso de esa cátedra, en 1934 vió prorrogado su nombramiento por cuatro años más.

Actuó igualmente en el campo de la Bacteriología Industrial. Primero con Tello, Hidalgo, Illera y Ramón, creó el Instituto biológico T. H. I. R. F., que, tras rápido y afortunado desenvolvimiento, se unió en 1929 al I. B. Y. S., pasando a ocupar la Dirección del nuevo I. B. Y. S.-T. H. I. R. F. Ha permanecido veinticinco años como Director de este Instituto, que en

ellos experimentó una colosal ampliación y transformación, conservando siempre una Sección de enseñanza de la Bacteriología.

Con su prestigio, experiencia y empuje promovió decisivamente la implantación y el desarrollo de nuestra industria de antibióticos, siendo Consejero fundador de la Empresa.

Su elevación de miras, su severa honestidad, lealtad y corrección le llevaron, con la confianza de todos, a la Presidencia de la Unión Española de Laboratorios.

Desde 1946 era Presidente de la Asociación Nacional de Médicos Especialistas de Análisis Clínicos, especialidad que cultivaba en su laboratorio privado de Investigaciones biológicas.

Representante de España en la Comisión permanente de la Asociación Internacional de Microbiólogos, en 1953 presidió la representación española en VI Congreso de Microbiología celebrado en Roma.

Su personalidad humana será inolvidable para cuantos tuvimos la fortuna de conocerle. Sencillo y altruísta, a todos recibía siempre con los brazos abiertos, dando a esta expresión nuevas dimensiones al sentirse cordialmente en ellos retenido. Buen tentemozo de los más jóvenes y humildes, sensible y filantrópico con todos, adonde fuera se entregaba con entusiasmo y era el más alegre y bueno por su carácter.

Sus últimos días fueron tranquilos. Sin violencias ni amarguras había sabido encontrar su puesto en la vida, y por su proceder inteligente, sereno y amable se diría que en ese puesto el medio se hubiera adaptado a la persona. Esta resultará difícil, muy difícil de reemplazar.

Cuantos le frecuentábamos sabíamos que, unido a su bella y enamorada esposa, caritativa y bondadosa en extremo, fué su vida de hogar un ejemplo hasta ese súbito final. Juntos nos abandonaron, como muchas veces lo anunciaran. Juntos reposan hoy en la tierra; como por buenos y por justos el Señor les habrá concedido una vida eterna también juntos.

M. D. S.

INSTITUTO I. B. Y. S.
LABORATORIO DE BIOQUIMICA

ESTUDIOS SOBRE PURIFICACION Y DESANTIGENIZACION ENZIMATICAS DE SUEROS Y PLASMAS ANTITOXICOS

I. DISCUSION DEL ESTADO ACTUAL DEL TEMA Y PLANTEAMIENTO DEL SISTEMA DE HIPOTESIS DE TRABAJO PROPIAS CON RESPECTO A LA CONCENTRACION DE LA FUNCION ANTITOXINA (*)

por
F. Cordón y A. Martínez

La presente comunicación constituye la introducción teórica a los trabajos experimentales que, con el propósito de purificar los sueros terapéuticos, están en curso de realización en nuestro Laboratorio del Instituto de Biología y Sueroterapia. Es, pues, una comunicación primera de una serie de ellas en las que se expondrán los resultados obtenidos por la experimentación en esta dirección de nuestro pensamiento científico.

Ahora bien, el sistema de preguntas que actualmente se plantea nuestro equipo tampoco procede de la abstracción teórica, sino de una larga etapa de labor experimental, efectuada por el mero apremio de la necesidad de preparar sueros antitóxicos de la máxima eficacia y de la mínima nocividad. En un principio el trabajo no alcanzaba a rebasar los límites de un empirismo que avanzaba por las rutas comunes seguidas por otros laboratorios. Una característica de la labor científica, que suele ser regla general de ella, es que sólo los hechos, cuando nos descubren aspectos imprevistos de la realidad, son los que pueden alumbrar direcciones inexploradas hasta entonces por el pensamiento. El pensamiento aislado, sin contacto con la naturaleza, con los hechos, escapa difícilmente al

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada en Madrid por la Sociedad de Microbiólogos Españoles el día 30 de marzo de 1954.

círculo de los prejuicios. El hombre de ciencia, por consiguiente, y tanto más cuanto más original sea su labor, tiene la impresión constante de que ésta le es impuesta desde fuera. Otra limitación, otra servidumbre del trabajo científico experimental es que la confirmación o negación de las hipótesis de trabajo que se alcancen a idear para interpretar hechos en contradicción con las propias intuiciones exigen largo tiempo de paciente labor. De este modo, el transcurso entre esta comunicación y las próximas que recogen los resultados de la labor experimental sobre nuestras propias hipótesis de trabajo, será un paradigma de la espera de resultados que es el estado normal del investigador.

* * *

El objeto de nuestro trabajo es el perfeccionamiento de los métodos de purificación de sueros antitóxicos. El problema tiene, ante todo, la importancia de que los sueros antitóxicos siguen siendo remedios insustituíbles para curar el tétanos y la difteria. Hace unas decenas de años la seroterapia era uno de los capítulos de la terapéutica en que se fundaban mayores esperanzas; los sueros se aplicaban para tratar numerosas enfermedades y se intentaban extender a otras. La eficacia de los remedios quimioterápicos y antibióticos ha rechazado, como es sabido, muy a segundo plano la importancia de los sueros inmunes en la curación de enfermedades microbianas cuyos efectos nocivos estén vinculados muy directamente al germen mismo. Ahora bien, el tétanos y la difteria tienen como característica notable (*) el que evidentemente estos gérmenes p e r s e no sean perjudiciales (el tétanos es incluso saprofito) y los efectos tóxicos se deban a productos liberados en su metabolismo que, tras un período de latencia y con independencia de los gérmenes, provocan el síndrome correspondiente. Podemos, pues, considerar que la toxina tetánica y la diftérica son los agentes directos de una y otra enfermedad; ahora bien, dichas toxinas son meras proteínas, desechos del germen vivo o muerto, carentes de organización y sobre las que, por consiguiente, no parece fácil que puedan actuar quimioterápicos o antibióticos. Los sueros antidiftérico y antitetánico, por esta circunstancia, en cuanto podemos

(*) Aunque lo notable no sea, tal vez, sino el grado en que se manifiesta una propiedad común a la acción patógena de todos los gérmenes; recordemos a este respecto el criterio de virulencia con que, dentro de las especies, se caracteriza a ciertas estirpes.

prever (y con todas las reservas respecto al valor de la previsión humana que nos ha hecho adquirir el desarrollo, tantas veces paradójico e inesperado, de la ciencia en los últimos años) conservarán inalteradas sus características de remedios exclusivos de las dos terribles enfermedades

* * *

Enfoquemos ahora el estado general de los hechos que hay que tener en cuenta para preparar sueros curativos eficaces. La preparación de sueros terapéuticos tiene dos fases: 1. la obtención de sueros brutos, y 2. el tratamiento conveniente de estos sueros brutos para obtener a partir de ellos sueros especiales que posean la máxima eficacia y que ofrezcan el mínimo riesgo de aplicación.

¿Cuáles son los problemas que plantea al investigador dicha primera fase, es decir, la preparación de sueros antitóxicos brutos? Comencemos recordando que, por sus características biológicas (receptividad para la difteria y el tétanos; capacidad de respuesta serológica; gran rendimiento de sangre, dado su tamaño; docilidad, etc.), el caballo es el animal empleado siempre para la obtención de sueros antitóxicos. Teniendo esto en cuenta podemos decir que los términos concretos del problema de la obtención de sueros brutos son: elegir la modalidad concreta de antígeno, el tipo biológico más conveniente de caballo y aplicar métodos de hiperinmunización y de sangría tales que los caballos rindan, al menor costo, sueros sanguíneos brutos en máxima cantidad y con máximo título de anticuerpos contra la difteria o tétanos, según el caso. Reservamos para una comunicación futura cómo hemos planteado este problema en nuestro Instituto Ibys; digamos sólo que el problema posee unas características muy especiales que obligan a abordarlo de un modo totalmente distinto al que es habitual para tratar los problemas normales que se resuelven por experimentación. Las características de este problema son, en dos palabras: 1. el enorme cúmulo de variables que influyen sobre el rendimiento (características del antígeno —esto es de la toxina o derivados de ella con que se inmuniza— y de sus coadyuvantes; características biológicas del caballo; y marchas del proceso de inmunización y del proceso de sangría, marchas indeterminables a priori porque van estando condicionadas por el estado general y la respuesta serológica del caballo); 2. el desconocimiento del proceso de inmunización, es decir, del proceso de formación de anticuerpos, que hay que confesar que no puede explicarlo la inmunología vigente, lo que nos priva de variables fundamentales en que apoyar una investigación con con-

ducción teórica. Intentamos resolver en nuestro Instituto el encauzamiento de esta investigación por el examen estadístico del proceso, con la ayuda de máquinas electrónicas de ficha perforada. Hay que esperar que la aplicación a problemas de esta índole (de variables múltiples, incontrolables —es decir, no inmovilizables a voluntad— y en gran parte desconocidas) de métodos estadísticos servidos por estos preciosos auxiliares pueda llevar, no sólo a mejorar empíricamente rendimientos, sino a esclarecer la esencia misma de los procesos.

* * *

Ahora bien, el tema concreto que nos ocupa y que ocupará otras comunicaciones futuras de nuestros resultados experimentales en esta dirección del trabajo, es el estudio de la segunda fase; es decir, de cómo preparar los plasmas especiales a partir de los plasmas antitóxicos brutos equinos (tal como resultan de la sangría del caballo inmunizado, después de separar de la sangre los elementos formes). Para centrar ideas, disponemos, pues, como material de partida, de plasma sanguíneo equino antitóxico. Si prescindimos de las sales y de otras substancias de pequeño peso molecular, inoperantes para la aplicación del plasma, éste, como es sabido, puede definirse como una disolución coloidal de numerosos tipos de moléculas proteicas, componentes normales de él albúminas α y β, globulinas α, β y γ, fibrinógeno, factores del complemento, protrombina, etc. De todas ellas las que realmente hemos de considerar, tanto porque constituyen la mayor parte del material proteico del plasma sanguíneo, como porque en ellas se incluyen las proteínas dotadas del efecto curativo (las antitoxinas), son las fracciones de albúminas y de globulinas α, β y γ.

Pasemos a exponer los términos del problema que plantea la preparación de plasmas antitóxicos de óptima calidad para ser administrados a los enfermos, a partir de los brutos. Para simplificar limitémonos a considerar el plasma como una disolución coloidal de moléculas proteicas de diversos tipos. De todas estas moléculas, como es sabido, sólo han adquirido la facultad de reaccionar específicamente con la toxina con que se inmunizó el caballo, neutralizando su efecto (es decir, sólo han adquirido en la inmunización del caballo afinidad específica para la toxina), una proporción más o menos alta, según el título del plasma, de un solo tipo de tales proteínas: las globulinas γ. Ahora bien, como también es de conocimiento general, todas las proteínas ajenas poseen la capacidad de

alterar de modo específico la reactividad del organismo cuando se las inyecta parenteralmente (esta capacidad, precisamente, es la que se ha aprovechado previamente en la inmunización del caballo con la toxina). Por consiguiente, el plasma obtenido por la inmunización activa del caballo, a la vez que suministra los anticuerpos específicos contra el antígeno con que se inmunizó el animal (según la terminología inmunológica, a la vez que inmuniza pasivamente contra la difteria, o, en su caso, el tétanos, por la administración de los anticuerpos preformados por el caballo) actúa simultáneamente como antígeno; es decir, inmuniza a su vez activamente, esto es, altera el modo de reaccionar el organismo frente a una segunda administración de dicho plasma, siguiendo el efecto general de todas las proteínas extrañas cuando se administran por vía parenteral. A h o r a b i e n, así como en la inmunización con la toxina resulta favorable la alteración específica del modo de reaccionar el caballo frente a la toxina en segunda inyección (ya que la alteración específica del modo de reaccionar su organismo se traduce en el hecho de que una substancia (la toxina) que en primera inyección resulta mortal a dosis increíblemente bajas, en la segunda resulta inocua por ser neutralizada por los anticuerpos circulantes, formados como consecuencia de la primera inyección), e n c a m b i o, en la inmunización con el suero (como es general para numerosísimas proteínas extrañas al organismo) la alteración específica observada como consecuencia de la primera inyección resulta perjudicial y consiste en que la segunda administración del suero, inocuo en la primera, puede resultar peligrosísima por desencadenar el trastorno patológico conocido por choque anafiláctico. Este efecto, según la opinión dominante, en nuestra opinión no totalmente fundada, se atribuye a la reacción de los antígenos administrados en la segunda inyección con anticuerpos formados como consecuencia de la primera anclados en la célula y no circulantes.

Por consiguiente, el plasma bruto, que constituye la materia prima para preparar los sueros especiales, posee dos funciones: u n a, que en mayor o menor grado es común a todas las proteínas ajenas al organismo, consiste tanto en sensibilizar para el choque anafiláctico cuando se administra parenteralmente por primera vez, como en desencadenar el choque cuando se administra en la segunda; la o t r a función es la curativa, que radica en los anticuerpos y es la capacidad adquirida por una proporción

mayor o menor de las globulinas γ de reaccionar específicamente con la toxina con que se inmunizó (diftérica o tetánica) neutralizándola.

En definitiva, el suero posee una función perjudicial, que alcanza a todas sus proteínas en su calidad de proteínas de caballo ajenas al hombre a quien se destinan, y una función útil propia del anticuerpo antitóxico. Por consiguiente, nuestra tarea en la preparación de sueros especiales puede enunciarse de modo preciso diciendo: que la purificación de sueros brutos consiste en concentrar la función útil con respecto a la función perjudicial; o, de otro modo, en eliminar la función peligrosa (la capacidad antigénica o capacidad anafilactizante de todo suero de caballo), conservando todo lo posible la función antitóxica de los anticuerpos.

Para efectuar esta tarea se ofrecen, a priori varias posibilidades:

Primera posibilidad. Un procedimiento evidente de purificación consiste en separar lo mejor posible las moléculas con función de anticuerpo de las restantes moléculas proteicas sin intervenir en la estructura o en la integridad de las moléculas nativas. Veamos rápidamente cuanto pueda alcanzarse por este camino. Según lo dicho, hemos de emprender la separación de diversas moléculas proteicas, todas las cuales, por tanto, poseen, prácticamente, la misma composición y funciones químicas (todas las proteínas, consideradas químicamente, son cadenas de α-aminoácidos enlazados entre sí por enlaces peptídicos); por consiguiente, el criterio de separación entre las proteínas útiles (los anticuerpos) y las restantes proteínas de lastre, no puede ser un criterio químico. La separación ha de apoyarse, pues, en el distinto valor que para cada tipo de proteínas presente una característica física (velocidad de sedimentación en el campo gravitatorio, solubilidad en mezclas hidroalcohólicas, solubilidad en disoluciones acuosas de diversa fuerza iónica, velocidad de transporte en un campo eléctrico, etc.). Precisamente, dicho entre paréntesis, gracias a los distintos valores de estas constantes físicas en tales moléculas proteicas, se ha conseguido irlas diferenciando unas de otras. Ahora bien, ¿cuál es el límite máximo de purificación a que podemos aspirar aplicando estos procedimientos? Podemos conseguir separar todas las globulinas γ (entre las cuales se cuentan los anticuerpos) de las restantes proteínas del plasma, pero no pasar de ahí. En efecto, del mismo modo que, hasta la fecha, no

se han encontrado diferencias químicas entre las diversas proteínas del plasma en que fundar una separación por un criterio químico, tampoco se encuentran diferencias físicas operantes en el seno de las globulinas γ que permitan un fraccionamiento ulterior de ellas; dicho de otro modo, físicoquímicamente las globulinas γ pueden considerarse homogéneas. Las globulinas γ (comprendidas las globulinas γ con función anticuerpo, en una palabra, los anticuerpo antitóxicos) pueden aislarse de las restantes proteínas del plasma por electroforesis, ya que, precisamente este método de fraccionamiento es el que ha permitido individualizar, y define, este tipo de globulinas. Ahora bien, la electroforesis no es un método aplicable a la industria; sin embargo, se aproximan bastante a los resultados obtenidos con él los que se logran por el método clásico de salado, es decir, los que se consiguen por la insolubilización selectiva de las proteínas en disoluciones con distinta fuerza iónica (en general se utilizan disoluciones de concentración convenientemente elegida de sulfato sódico, amónico o magnésico, en las cuales unos tipos de proteínas del plasma se insolubilizan y otros quedan disueltos); después de separar los electrolitos por diálisis (con lo que se consigue la redisolución de las proteínas insolubilizadas) se logran diversas fracciones relativamente homogéneas. De antiguo, las fracciones así obtenidas (diferenciables por este criterio) se denominan, enunciadas de más a menos soluble, albúmina, pseudoglobulina y euglobulina. Ninguna de ellas corresponde a especies químicamente puras; pero podemos decir que la intermedia, la denominada de pseudoglobulina, está constituída fundamentalmente por las globulinas γ. Este método de fraccionamiento no ofrece dificultad práctica y logra su propósito teórico con buen rendimiento y sin destruir apreciablemente la función anticuerpo.

Naturalmente, este método brinda una purificación evidente, ya que, con poca merma de anticuerpos, elimina una cantidad de proteínas inertes, que constituyen las fracciones denominadas de albúmina y de euglobulina, que suponen los dos tercios aproximadamente de las proteínas totales del plasma. Pero de ningún modo podemos considerar alcanzado los propósitos de la purificación. En efecto, 1, las globulinas γ con función de antitoxina no constituyen sino una fracción, en general corta, del conjunto de las globulinas γ (entre las globulinas γ se encuentran anticuerpos adquiridos por el caballo en el curso de otras inmunizaciones, provocadas por el hombre, por alguna enfermedad observada o criptogenéticas; se cuentan también anticuerpos naturales; y, por último, globulinas γ sin

especificidad frente a ningún antígeno —por decirlo así, inmunológicamente vírgenes— o, al menos, sin especificidad conocida); pero, además, 2, las globulinas γ (tanto las dotadas de función antitóxica como las que no lo están), por su carácter de proteínas de caballo (esto es ajenas al hombre), poseen, como las restantes proteínas del plasma equino, la función nociva que hemos de eliminar en lo posible de los plasmas terapéuticos. Una y otra razón fuerzan, pues, a proseguir la purificación.

Respecto al primer punto, recordemos un hecho fundamental. Al parecer, nada distingue físicoquímicamente un anticuerpo de una globulina γ no dotada de su especificidad inmunológica. Por ejemplo, si se inmuniza un conejo con globulina γ de un caballo normal y otro conejo con antitoxina diftérica equina, los dos sueros de conejo que se obtengan reaccionan indistintamente con la globulina normal y la antitóxica usadas como antígeno para uno y otro animal. Y hay que decir que por la inmunización se alcanzan a distinguir diferencias de estructura que no logran apreciar los métodos químicos más finos. El único carácter diferencial conocido entre un anticuerpo y una globulina normal es la afinidad «sui generis» que ha adquirido el anticuerpo (en nuestro caso, la antitoxina) con respecto al antígeno a que debe su formación (la toxina). Como esta afinidad se traduce no sólo en una neutralización del poder tóxico de ésta, sino en una precipitación del complejo que forman al mezclarse, sobre esta propiedad (ya exclusiva del anticuerpo) podría fundarse un método que permitiera separar el anticuerpo de las restantes globulinas γ. Ahora bien, este método, que a veces se aplica para aislar pequeñas cantidades de algún anticuerpo con fines científicos, no resulta aplicable a la industria. Pero, además, dejaría aún sin resolver la segunda purificación exigida, ya que la antitoxina, aun supuesta pura, seguría siendo soporte de ambas funciones, la curativa y la perjudicial.

Para acabar de exponer las facetas del problema con que nos enfrentamos hemos de señalar dos importantes notas diferenciales entre la función anticuerpo, útil, y la función anafilactógena, nociva, que hemos de separar. La función antitoxina posee dos caracteres notables: el primero el de radicar en una alteración estructural de la globulina de índole desconocida y que no altera la estructura fun-

damental que la molécula poseía antes de adquirir, por la inmunización, el marcado de su afinidad específica para con la toxina; el segundo carácter es el de reaccionar estequiométricamente con el antígeno (si bien en una reacción en que intervienen fuerzas de segundo orden), de modo que toda pérdida de anticuerpos se traduce en pérdida de título neutralizante, de efectividad, del plasma que se purifica. En cambio, la función anafilactógena, que pretendemos eliminar, posee justamente los dos caracteres opuestos, es decir, primero, el carácter de anafilactógeno está vinculado a la estructura básica de cada molécula proteica, de modo que toda alteración estructural de ella (natural o provocada in vitro) se traduce en un cambio de la especificidad de la reacción anafiláctica (hace una rara excepción la transformación de una globulina normal en anticuerpo, al parecer porque, como hemos razonado, el carácter de anticuerpo surge de una alteración de la globulina normal que no repercute en la estructura «química», por decirlo así, de la globulina); el segundo carácter de esta función perturbadora es que su efecto, al contrario del correspondiente de la útil, no es proporcional a la cantidad de substancia activa. En la experimentación con cobayos se observa que bastan cantidades increíblemente bajas de proteína anafilactógena para que se produzca la sensibilización de los animales, como si el animal receptor supliera, por un mecanismo amplificador, lo ínfimo de la dosis recibida. Se impone, pues, la eliminación de modo absoluto de las moléculas proteicas dotadas de función anafilactógena, lo que dificulta grandemente la solución ideal del problema.

Segunda posibilidad. Puede también intentarse la concentración de la función anticuerpo interviniendo previamente en la estructura o integridad de las moléculas del plasma antitóxico. Es sabido que para purificar los plasmas antitóxicos se ha recurrido empíricamente desde hace unos veinte años a la aplicación de enzimas proteolíticos, y que, de hecho, éstos se utilizan actualmente en todos los laboratorios del mundo que preparan plasmas y sueros terapéuticos antitóxicos. Cuando nos enfrentamos por primera vez con el problema de la purificación de sueros, hubimos, pues, de considerar seriamente cuál sea el papel de los enzimas

en la purificación de sueros y plasmas que, aun careciendo de interpretación teórica, sanciona la experiencia.

A primera vista se impone una posible explicación que, cuando reflexionábamos sobre este punto, al iniciar nuestros trabajos, nos parecía la única posible: al desdoblar las globulinas γ por un enzima se obtienen fragmentos proteicos y, teóricamente, puede concebirse que al demoler la molécula ésta pierda antes su capacidad sensibilizante que su función de anticuerpo. Hemos trabajado largamente en este sentido; iremos dando cuenta de nuestros resultados y, ante todo, en una próxima comunicación, discutiremos las hipótesis de trabajo que conducen nuestra investigación con respecto a la desantigenización de sueros antitóxicos. No hay que decir que la guía analítica para seguir la eficacia respecto a este propósito de una digestión emprendida de una cierta manera no puede ser más que determinar, en el curso de la digestión del plasma antitóxico, la pérdida paulatina de una y otra función para elegir las condiciones de la digestión y la profundidad a que interrumpir ésta, en que se destruya más profundamente la capacidad anafilactógena con la menor pérdida posible de anticuerpo. Las dificultades mayores de esta tarea experimental son, en nuestro planteamiento, tres: 1. Conseguir un método de valoración rápido de la función anticuerpo que evite la interferencia enojosa de los pH a que haya que efectuar la digestión y la presencia, a veces perturbadora, del enzima mismo. La resolución práctica que dimos a este problema fué expuesta en su día ante la Sociedad de Microbiólogos (1). 2. Más importante y difícil es valorar rápidamente la capacidad anafilactógena. En efecto, la sensibilización de un animal por un anafilactógeno requiere, como es sabido, al menos unas tres semanas, lo que retrasa enormemente la ejecución de una serie de experimentos, cada uno de los cuales ha de determinar el planteamiento del siguiente. Lo conseguido ya por nosotros en este sentido nos permite decir que no consideramos imposible que lleguemos a establecer un método de diagnóstico precoz de la inmunización. 3. Por último, dificulta el problema el hecho de que para que el efecto sensibilizador pueda ser ejercido con gran intensidad, baste, como hemos dicho, que un corto número de moléculas conserven la capacidad anafilactógena; este hecho nos da en nuestro sentir una indicación de cómo deba transcurrir idealmente la digestión: creemos que hay que orientarla de modo que comiencen sufriendo la proteolisis simultáneamente la mayoría de las moléculas.

Pero además, según autores serios, y según la experiencia indudable de los laboratorios encargados de la fabricación de sueros, mediante la aplicación de enzimas proteolíticos puede también conseguirse el enriquecimiento químico de las proteínas con función anticuerpo con respecto al total de proteínas. En un principio, como dijimos, al analizar el problema no entendíamos cómo podría lograrse este resultado.

Parfentjev, el primer autor que emprendió este método de purificación, lo interpretaba admitiendo que la aplicación de proteínas (concretamente de pepsina) lograba concentrar los anticuerpos, porque a) la fracción de albúmina se digiere fácilmente, b) la fracción de euglobulina resiste más la digestión péptica, pero se altera de modo que precipita en medio ácido y c) que, en la digestión suave, que él establece empíricamente, la pseudoglobulina (que contiene, repetimos, las antitoxinas), es la única fracción que no se altera (2). Ahora bien, aun si así fuera, evidentemente no se conseguiría nunca una purificación mayor que la lograda por el método de salado. Y, en efecto, del examen crítico efectuado en nuestro laboratorio, apoyado en la experimentación pertinente (véase esta misma revista (3), se saca la conclusión de que carece de sentido aplicar pepsina (o en general una proteinasa) para separar selectivamente, por su resistencia a los enzimas, la globulina-antitoxina de las restantes proteínas del plasma. Persiguiendo esta finalidad concreta se consiguen mejores resultados por los métodos físicos de aislamiento de los diversos grupos de globulinas del plasma de que antes hablamos, y que se fundan en características físicoquímicas de las distintas moléculas nativas.

¿Cómo se explica, pues, que por la aplicación de enzimas pueda pasarse, al parecer, de este límite de purificación que parecen marcarnos la proporción entre las globulinas-anticuerpo y el total de globulina γ? Al parecer la solución puede ofrecerla una observación fortuita de Pope (4), cuyo análisis detallado dejamos para otra comunicación. Pope, al intentar separar por coagulación selectiva, a temperatura suave, la fracción antitóxica de la inactiva de las pseudoglobulinas, observó que se consigue resultado favorable (coagulación de producto preferentemente inactivo; mantenimiento en disolución de gran parte de la función anticuerpo) si previamente la pseudoglobulina había sufrido una acción suave (¿proteolisis ligera?, ¿mera desnaturalización?) ejercida por un

enzima proteolítico. Estudios anteriores de Pappenheimer (5) habían ya señalado que una digestión péptica poco profunda y a un pH conveniente escinde la molécula de anticuerpo (y de las demás globulinas γ) en dos porciones de tamaño distinto, aunque semejante, y que pueden separarse entre sí por su distinto peso molecular, una de las cuales porta la función anticuerpo. No hay que decir que este hecho, teóricamente al menos, puede permitir una mayor concentración de la función anticuerpo con respecto al material proteico total, ya que elimina —al parecer con escasa pérdida de función anticuerpo— un fragmento inerte de las moléculas de globulina que supone del orden de un 40 por ciento del material proteico con que todavía contábamos una vez efectuada la purificación por salado.

Ahora bien, esta aseveración de que la pepsina escinda por la mitad la molécula de anticuerpo está en contradicción con la representación mental, el prejuicio, que nosotros teníamos de la acción proteolítica. En efecto, la relación entre substrato y enzima que se da en la proteolisis enzimática ofrece el carácter particular de que cada molécula de substrato (cada molécula de la proteína sometida a digestión) presenta un número muy alto de enlaces peptídicos escindibles por el enzima. Como consecuencia, no podíamos dejar de suponer, *a priori*, que la aplicación de pepsina (o de otra proteinasa cualquiera) a una mezcla de varias proteínas habría de conducir a una mezcla totalmente heterogénea de fragmentos muy diversos, separados por cortes dados al azar en los numerosos enlaces peptídicos que posee cada molécula de substrato. En definitiva, la aplicación de una proteinasa a una mezcla de proteínas, con el fin de lograr la separación selectiva de una función adscrita a una de ellas, nos parecía, de antemano, inapropiada, ya que creíamos que habría de tener la consecuencia de complicar de tal modo la mezcla que la haría irresoluble, en lugar de simplificarla.

Pero el hecho de que una proteína ofrezca un lugar que sufra preferentemente la escisión ejercida por el enzima cambia los términos del problema. En primer lugar, hace químicamente posible conseguir previa aplicación de enzimas concentrar la función de anticuerpo más que por simple salado; en efecto, la función de anticuerpo queda soportada, después de la suave escisión enzimática, por una molécula homogénea y de tamaño menor que la molécula de globulina γ nativa y, además,

la mezcla de fragmentos resultante de tal proteolisis no es mucho más complicada que la mezcla de partida (es decir, sigue ofreciendo posibilidades de ser resuelta analíticamente). Pero, en segundo lugar, abre un campo de experimentación que tal vez guarde conclusiones de alguna trascendencia teórica. Como este campo constituye uno de los temas fundamentales de nuestra investigación sobre purificación de antitoxinas, damos a continuación las líneas generales de los problemas que creemos plantea.

1. El primer punto que hemos decidido esclarecer es si dicha escisión enzimática de la globulina en los dos fragmentos se efectúa por un solo corte de un enlace peptídico (como nos llevaba a admitir una primera idea poco reflexionada) o si (como ahora más bien nos inclinamos a pensar) exige soltar una serie de tales enlaces. Para contestar a este punto importante, hemos de medir, naturalmente, el número de enlaces peptídicos escindidos (por los incrementos de grupos carboxilo o amino liberados) en función del número de partículas independientes. Haremos esta segunda determinación por la medida, por osmometría, del peso molecular medio de las partículas contenidas en los digeridos proteicos.

2. En segundo lugar, si cada desdoblamiento de la molécula en dos partes independientes implicara una sucesión de cortes, habría que dilucidar si (como parece imponer, en nuestra opinión, la posibilidad de aplicar proteinasas a la purificación de antitoxinas) en las globulinas existe realmente una superficie determinada de fisura más fácil. Si esto es así parece indudable que la mezcla de fragmentos resultante de someter a una digestión conveniente que doble la concentración molar una disolución de globulinas γ habría de resultar de homogeneidad máxima. La decisión del segundo problema se reduce, pues, desde el punto de vista experimental, a establecer y aplicar criterios del grado de homogeneidad en cuanto al peso de las partículas disueltas.

De momento estamos aún ocupados en resolver experimentalmente el punto anterior, de modo que carecemos de experiencia con respecto a cómo apreciar cuál sea el grado de homogeneidad de tamaño de una disolución de fragmentos proteicos. No podemos, pues, precisar las dificultades prácticas con que hayamos de tropezar al hacer esta determinación. Por consiguiente, hemos de limitarnos a exponer cómo pensamos abordar este problema.

Para comparar el grado de homogeneidad de los tamaños de partícula disuelta de varias disoluciones que posean el mismo número de partículas disueltas (por ejemplo para comparar a este respecto una serie de digeridos enzimáticos obtenidos por digestiones llevadas de distinto modo pero, detenidas, todas al doblarse la concentración molar del substrato puede determinarse el porcentaje ponderal o el numérico, que suponen las partículas que rebasen de cierto tamaño y el porcentaje que suponen las que no alcancen otro. Como criterio adecuado para establecer tales porcentajes pueden usarse métodos físicos de separación en los que influya, como variable determinante fundamental, el tamaño de partícula; ultrafiltración selectiva por membranas de permeabilidad conocida, ultracentrifugación fraccionada, fraccionamiento por la distinta difusibilidad de las partículas, precipitación por agentes precipitantes de proteínas de peso molecular alto (ácido tricloroacético, ácido sulfosalicílico, etc.). También pueden dar indicaciones valiosas otros métodos de fraccionamiento, en los que, aunque el tamaño de partícula no sea la propiedad única o fundamental, sí sea una variable claramente operante: electrodiálisis por membranas de permeabilidad conocida, examen del espectro electroforético obtenido en condiciones especiales bien establecidas, precipitación selectiva por cambios de la fuerza iónica de la disolución, adsorción fraccionada empleando adsorbentes convenientemente elegidos, etc.

Además de estos métodos físicos, que podemos calificar de directos, para conocer el grado de dispersión en los tamaños de las partículas disueltas (en nuestro caso resultantes de la digestión enzimática de seroglobulinas), pensamos que puede recurrirse también a un método biológico cuyo fundamento queremos adelantar aquí: La función sensibilizante de un anafilactógeno (sobre todo cuando se utiliza como animal de experimentación el cobayo) se ejerce con plena intensidad con cantidades increíblemente bajas del anafilactógeno; hasta cierto grado, la intensidad del estado de sensibilidad específica (de anafilaxia) creado es independiente de la dosis con que se sensibiliza, de modo que los animales se sensibilizan o no, pero —de sensibilizarse— la gravedad con que se producirá el choque frente a una dosis desencadenante fija puede ser muy alta, independientemente de que la dosis con que se sensibilizó fuera muy baja. Por otra parte, la capacidad sensibilizante exige que el anafilactógeno posea un peso molecular relativamente elevado (es decir, los haptenos, si bien desencadenan, no sensibilizan). De estas dos propiedades de la función sensibilizante se deduce que, si sometemos a digestión un anafilactógeno, la disolución no perderá, prácticamente, su capacidad sensibilizante hasta que no hayan desaparecido, puede decirse que en absoluto, todas las partículas que rebasen de un cierto tamaño. Por

consiguiente, creemos probable que la pérdida de la capacidad sensibilizante pueda ofrecer una indicación bastante precisa de cuál sea la profundidad de digestión mínima necesaria para que desaparezcan todas las partículas de tamaño grande. Ahora bien, esta desaparición absoluta se verificará tanto más tarde cuanto más heterogéneo sea el digerido resultante, es decir, que dicha profundidad puede ofrecernos una medida indirecta de la heterogeneidad con que se produce la digestión en las condiciones en que se haya llevado a efecto; por tanto, puede ayudar a establecer las condiciones de digestión que den origen a un digerido lo más hemogéneo posible en cuanto a tamaño de partícula (elección de proteinasa, proporción enzima/substrato, modo y tiempo de incorporar el enzima, pH, etc.); téngase en cuenta que conducir la digestión de modo que rinda un producto homogéneo es, en nuestra opinión, de importancia fundamental en la purificación de sueros por vía enzimática, y ello por dos razones: 1. porque, como hemos dicho en páginas anteriores, sólo si la acción enzimática es dirigida puede resultar posible la separación ulterior de fragmentos activos e inactivos y así concentrar la función anticuerpo que soportan los primeros, y 2. porque cuanto más homogéneos sean los productos de la digestión, tanto menor será también el número de fragmentos pequeños producidos al eliminar totalmente los grandes, es decir, tanto mayor será la función anticuerpo conservada después de destruir la capacidad anafilactógena.

3. Si se confirma nuestra suposición (planteada en 1) de que cada escisión en dos fragmentos de una molécula proteica supone la ruptura de un cierto número de enlaces (¿peptídicos, puentes S-S?), y teniendo en cuenta los resultados de Pope (4 y 6), Peterman y Pappenheimer (7), Harms (8), Glaubiger (9), Bourdillon (10), Sandor (11), Hansen (12) y otros, según los cuales la molécula de globulina γ, sometida a una digestión enzimática conveniente, puede escindirse de modo regular en dos fragmentos, hay que sacar la conclusión de que en la molécula de globulina γ existe una superficie de fisura preferente. Esta es la conclusión importante que puede deducirse del trabajo experimental que realizamos en la dirección marcada en 1 y 2.

* * *

Evidentemente, la confirmación de este aserto plantearía toda una serie de nuevos problemas teóricos que conciernen a la estructura de la

molécula proteica, a la manera de actuar las proteinasas y, por último, tal vez, a la naturaleza de la función anticuerpo. Pasemos a exponer sumariamente las grandes líneas de los problemas teóricos cuya solución cabe acercar siguiendo esta dirección de la experimentación.

a) La primera duda fundamental que se plantea es si el papel que el enzima desempeña en todos los cortes de enlace necesarios para que se produzca una fisura es o no siempre el mismo. En efecto, podemos concebir que una fisura de la molécula en dos porciones se efectúe por uno de los dos modos siguientes

Primer tipo posible de escisión dirigida. La molécula de proteinasa puede suponerse que se fija a la molécula de globulina en virtud de afinidad mutua y que, a consecuencia de esta unión, se produce un corte de un enlace peptídico de la globulina; dado el papel de catalizador de la proteinasa, la molécula de ésta recupera después de la reacción su estado inicial y vuelve a cortar otro enlace peptídico (de la superficie de fisura preferente) y así continúa hasta que, una vez cortados todos los enlaces de la superficie de fisura, la molécula de la globulina se ha escindido en dos fragmentos independientes (uno de ellos la «split antitoxin» de Bourdillon). Indudablemente, según esta interpretación, todos los cortes necesarios para que se produzca la escisión de la globulina en dos fragmentos son equivalentes.

De ser ésta la manera de producirse la escisión, dentro de ella caben dos posibilidades teóricas: Una, que después de producirse cada corte de un enlace peptídico la molécula de proteinasa que lo ha efectuado quede libre y en disposición de fijarse al azar sobre una molécula de substrato cualquiera; éste es el concepto que generalmente —intuitivamente— se tiene de la manera de actuar las proteinasas; ahora bien, no parece estar muy de acuerdo con el fenómeno de la escisión dirigida; de ser el que realmente convenga con la realidad, habría que suponer que la causa de la escisión dirigida es que en la molécula de globulina existe una zona (la de fisura) que posee especial afinidad para la proteinasa. La otra posibilidad es que la molécula de la proteinasa no se suelte de la molécula de globulina después de efectuar cada corte, sino que permanezca anclada a ella en tanto que no se corten todos los enlaces de la superficie de fisura.

Si se confirmara que todos los cortes efectuados por el enzima son

equivalentes en el sentido dicho, no parece demasiado difícil decidir, experimentalmente, cuál de las dos posibilidades sea la verdadera. En efecto, es fácil ver que si el mecanismo de la digestión de las globulinas se produjera según la primera posibilidad, la eficacia de la acción de cada molécula de proteinasa en cuanto al número de partículas totalmente escindidas por ella —no al número de cortes—, en los primeros momentos de la digestión, será independiente de la concentración relativa de substrato; lo que de ningún modo sucederá si los hechos convienen con la segunda posibilidad.

Ahora bien, algunos hechos parecen oponerse, en principio, a que todos los cortes necesarios para que la fisura de la globulina se produzca sean equivalentes en cuanto al modo de haber sido producidos por el enzima. A este respecto nos parece digno de ser considerado el hecho de que, al parecer, según el mismo Pope, pueda conseguirse desdoblar por la superficie de fisura conveniente aplicando distintas proteinasas (fibrinolisina, con la que descubrió Pope el fenómeno; pepsina, habitualmente aplicada; tripsina; papaína, etc.); ahora bien, estas proteinasas difieren considerablemente en cuanto al espectro de los enlaces peptídicos que escinden (según los importantes trabajos de Bergmann), lo que no armoniza de ningún modo con la hipótesis de la existencia en la molécula de globulina de una superficie de fisura preferente, común a dichas proteinasas.

Segundo tipo posible de escisión dirigida. Pero cabe también suponer que los cortes de enlace necesarios para que la molécula de globulina se escinda en dos fragmentos independientes no son equivalentes en cuanto a la acción del enzima. Puede admitirse, en efecto, que la molécula de proteinasa, una vez unida a la de proteína por su afinidad mutua, se limite a cortar un enlace peptídico y que esta acción tenga como consecuencia una alteración tal de los campos de fuerza que mantienen la estructura de la molécula que este primer corte repercuta, de modo secundario, en la ruptura de los restantes enlaces que constituyen la superficie de fisura. Habría, pues, que distinguir un único corte primario, efecto de la acción directa del enzima, y una serie de cortes secundarios (fuera ya del campo de acción del enzima) a consecuencia del primer corte.

Si a consecuencia de la acción de la proteinasa se verificara así, de hecho, el desdoblamiento de la molécula de globulina en las dos porcio-

nes independientes, parece probable que en el fraccionamiento habría de observarse no sólo la apertura de enlaces peptídicos, sino la de enlaces de otro tipo. (Creemos que en el futuro habrá que considerar detenidamente desde este punto de vista tres grupos importantes de acciones ejercidas sobre moléculas proteicas: 1. la desnaturalización proteica por agentes físicos o químicos, 2. el efecto lab que ejercen inicialmente sobre caseína la mayoría de las proteinasas, y 3. las acciones mutuas de desdoblamiento en dos fracciones que ejercen unas sobre otras algunas moléculas proteicas del sistema de coagulación de la sangre.)

En resumen, el proceso por el que la proteinasa desdobla la molécula de globulina en dos fragmentos por una superficie de fisura constante, plantea problemas interesantes y probablemente resolubles con respecto a 1. si el enzima actúa sucesivamente sobre cada uno de los enlaces necesarios para que se cumpla el desdoblamiento en dos porciones independientes, o bien si la acción ejercida por el enzima sobre uno de los enlaces repercute indirectamente en la apertura solidaria de toda la superficie de fisura, y 2. caso de que el proceso real correspondiera a la primera posibilidad, si el enzima queda o no en libertad después de cada corte.

b) Una segunda cuestión importante, que hay que resolver experimentalmente, es si el fenómeno de que la molécula de globulina se escinda enzimáticamente en dos porciones por una superficie determinada ha de considerarse consecuencia de una propiedad de la molécula de seroglobulina o de la molécula de proteinasa (es decir del substrato o del enzima).

Para resolver experimentalmente esta cuestión, es evidente que hay que comparar los efectos de todas las proteinasas, en el estado de máxima pureza posible, sobre seroglubulina también pura. Si se confirmara que al aplicar cualquiera de estos enzimas, en condiciones convenientes, durante el tiempo necesario para conseguir doblar el número de partículas de seroglobulina, se abre el mismo número de enlaces peptídicos y de enlaces disulfuro habría que llegar a la conclusión firme de que la superficie de fisura debe considerarse propiedad de la molécula de seroglobulina (dado que, como se ha recordado, el espectro de enlaces peptídicos escindibles por cada proteinasa no coincide de unas a otras). Ahora bien, si lo que resultara de la observación experimental fuera, por el con-

trario, que la molécula de seroglobulina se desdobla según distintas superficies de fisura por cada una de las proteinasas, sería ya dudoso (como luego veremos, pág. 284) que este fenómeno deba considerarse resultado de una propiedad característica de la molécula de seroglubulina y no de una propiedad característica de las diversas proteinasas.

No hay que decir que la confirmación de la primera posibilidad (es decir, la confirmación de que la escisión enzimática dirigida de la molécula de seroglobulina haya de considerarse propiedad característica de esta molécula) nos permitiría afirmar que tal desdoblamiento enzimático se efectúa según el segundo tipo posible de escisión dirigida (pág. 281); por el contrario, la confirmación de la segunda posibilidad (es decir, la confirmación de que la escisión enzimática dirigida de la molécula de seroglubulina haya de considerarse propiedad característica de la proteinasa empleada) haría sumamente probable que el desdoblamiento se efectúa en la realidad por el primer tipo posible de escisión dirigida (pág. 280) (téngase en cuenta que, a priori, la proposición recíproca de la última aseveración —como se dice al final del párrafo anterior— no es necesariamente cierta).

Como problema secundario, sobre todo teniendo en cuenta que, de antemano, los hechos conocidos nos parece que señalan más bien al segundo tipo posible de escisión, cabría determinar en las distintas proteinasas lo que podría denominarse constante de reiterabilidad de la acción de cada proteinasa. Ya hemos dicho que es digno de notarse que las proteínas constituyen un tipo especial de substrato en el sentido de que cada molécula ofrece al enzima un gran número de enlaces escindibles por él; se plantea, pues, el problema de si, en el momento de efectuarse la escisión de un enlace de una molécula concreta de una proteinasa dada, existe o no más probabilidad de que el siguiente enlace escindido por dicha molécula de proteinasa pertenezca a la misma molécula de substrato que a otra distinta.

La constante reiterabilidad carece de sentido dentro del segundo tipo posible de escisión dirigida; en este tipo de actuación hipotética, la proteinasa no puede decirse que ejerza una acción reiterativa, sino una acción única, aunque trascendente; ahora bien ¿cómo distinguir los efectos de una acción única trascendente de los de una acción reiterativa? No veríamos ninguna posibilidad si no se dispusiera más que de una única proteinasa; pero, como hemos desarrollado ya en el apartado a) (págs. 280 a 282), de la comparación de los efectos de la escisión dirigida por diversas proteinasas, tal vez pueda deducirse

una opinión fundada con respecto a si la acción de cada una de ellas corresponde a uno u otro tipo. Concretamente, creemos que si todas las proteinasas dirigieran la escisión por una misma superficie de fisura, podría afirmarse que todas ellas ejercen una única acción que repercute de modo secundario en la ruptura de todos los enlaces de dicha superficie —es decir, que no se trata de acciones reiterativas, sino de una única acción trascendente—; en cambio, en caso de que cada proteinasa abra su propia superficie de fisura, el problema quedará, de momento, sin resolver, ya que puede concebirse t a n t o que cada proteinasa reitere su acción eligiendo una ruta propia de enlaces con afinidad selectiva para ella, c o m o que se limite a elegir preferentemente un determinado enlace inicial, distinto para cada una, y que la trascendencia del enlace (superficie de fisura) sea, en consecuencia, distinta.

Merece tenerse en cuenta que de ningún modo puede descartarse, sin pruebas experimentales, la posibilidad de que una proteinasa actúe según el segundo tipo posible de escisión dirigida (corte único trascendente) cuando la molécula de seroglobulina esté intacta o se trate de un fragmento grande de ella y que, en cambio, sus cortes carezcan de toda consecuencia secundaria sobre otros enlaces cuando el substrato sea un fragmento menor de la molécula nativa. (Habría que discutir —de confirmarse tal caso—, si el fenómeno habla en favor de que la molécula de seroglobulina está integrada por una suerte de subunidades, separables entre sí por dicha acción única trascendente, que, en cambio, ya no resulta operante dentro de ellas.) Podría, pues, suceder que la proteinasa a c t u a r a i n i c i a l m e n t e por cortes únicos, trascendentes y que t e r m i n a r a s u a c c i ó n por cortes no trascendentes que, en cambio, pudieran ser reiterativos. También merece tenerse en cuenta, como otra posibilidad, que la proteinasa actuara por cortes trascendentes a toda la superficie de fisura, y que esta acción fuera además reiterativa, es decir, que el enzima pudiera quedar adscrito a uno de los dos fragmentos (resultantes, del modo dicho, de cada acción suya) sobre el que repitiera la acción única trascendente.

Ahora bien, lo probable es que la c o n s t a n t e d e r e i t e r a b i l i d a d de la acción de las proteinasas no tenga sentido de no confirmarse que la escisión de la molécula de seroglobulina por superficies de fisura preferente se verifica por cortes independientes dados a los enlaces que la constituyen (primer tipo posible de escisión dirigida). En tal caso —al que, a p r i o r i, no nos sentimos muy inclinados— tendría pleno sentido hablar de esta constante que distinguiría entre sí unas proteinasas de otras por la inercia relativa a quedar adscritas por afinidad a la molécula de substrato de la que acaban de cortar un enlace. En cierto sentido tal constante equivale a la constante de

Michaelis. Por los distintos valores de la constante de Michaelis se expresan las afinidades relativas entre un enzima y cada uno de sus distintos substratos (tiene, por ejemplo, especial aplicación entre las carbohidrasas, cada una de las cuales, como es sabido, hidroliza una serie de glucósidos formados todos por un determinado monosacárido al que se adapta estrictamente su especificidad de acción, y un aglicón cualquiera, que, sin embargo, opera de un modo u otro sobre la velocidad de la acción); la constante de reiterabilidad de acción sería sólo aplicable a aquellos enzimas cuyos substratos ofrecieran en cada molécula muchos puntos de ataque para su acción y, en cierto sentido, constituiría una medida de la afinidad entre la molécula de uno de tales enzimas y la molécula-substrato escindida. Terminemos subrayando que, caso de que la acción de una proteinasa sobre la seroglobulina sea reiterativa, tendría máxima importancia determinar cuáles sean la proteinasa de mayor constante de reiterabilidad sobre este substrato y las condiciones para que, con tal proteinasa, se produzca una acción reiterativa máxima, condiciones que, sin duda, serían las más favorables para la purificación enzimática de sueros y plasmas. En este sentido, este estudio, aparte de su importancia teórica, que esbozamos a continuación, tiene gran valor práctico. Como veremos en una próxima comunicación, la trascendencia de esta constante (siempre en el caso de que las proteinasas actúen según el primer modo posible de escisión dirigida) sería también fundamental para orientar convenientemente la desantigenización por vía enzimática de los sueros antitóxicos.

c) Pasemos ahora al tercer problema teórico general que nos plantearía la confirmación de que en la molécula de globulina γ exista una superficie de fisura preferente frente a la acción enzimática. (Como dijimos en la pág. 279, en vista de los hechos conocidos de la purificación de sueros o plasmas antitóxicos, habría que aceptar la existencia de tal superficie si se confirmara experimentalmente nuestro supuesto de que la escisión por proteinasas de la molécula de seroglobulina en dos fragmentos, siempre los mismos, supone el corte de un cierto número de enlaces.) Este tercer problema es dilucidar si este fenómeno observado en la acción de las proteinasas sobre la seroglobulina se limita a este substrato o si, por el contrario, se extiende a otras proteínas. Por consiguiente, proyectamos una ulterior labor experimental que consistirá en someter al mismo estudio que hemos planeado para la seroglobulina a otras proteínas que elegiremos tales que se puedan obtener en estado de relativa pureza, sin desnaturalizar y con características físicoquímicas y biológicas

que convengan a la resolución del problema (por ejemplo, esferoproteínas de alto peso molecular que posean un grupo prostético cuya acción pueda valorarse).

Evidentemente, dos son las soluciones que cabe esperar de esta labor experimental: que la presentación de superficies de fisura preferente sea una propiedad particular de las seroglobulinas (o de un grupo o tipo de proteínas en las que estén incluídas las seroglobulinas) o que, por el contrario, sea una propiedad general de las proteínas. No hay que decir que la significación biológica del fenómeno habrá de ser muy distinta en uno y otro caso. Consideremos una y otra, a continuación, muy sumariamente.

Si la presentación de superficies de fisura preferente frente a la acción de proteinasas resultara ser exclusiva de las globulinas γ (o de las seroglobulinas en general), estaríamos cerca de sentar dos conclusiones: 1. que la propiedad dicha radica en el substrato, no en el enzima (ofreciendo un dato de suma importancia para la resolución de la cuestión discutida en b), págs. 282 a 285), y 2. que la propiedad dicha está relacionada de un modo u otro con las funciones o con la formación de las seroglobulinas en el organismo. Respecto a esta última conclusión hipotética, digamos que, caso de plantearse, obligaría a relacionar dichos planos de fisura hipotética con dos notas biológicas características de las seroglobulinas (relación de la que cabría esperar alguna aclaración de ellas): ser soporte de la función anticuerpo y ser constituyentes normales de la sangre (a este último respecto recordemos que, dentro del complejo sistema de substancias que intervienen en la coagulación de la sangre, hay, al parecer, alguna substancia que experimenta una escisión dirigida por efecto de otra del mismo sistema).

Si, por el contrario, la presentación de superficies de fisura preferente frente a la acción de proteinasas fuera una propiedad que presentaran en general numerosas proteínas, adquiriría extraordinario interés, para la discusión de la significación biológica del hecho, la resolución previa de la cuestión discutida en b). En efecto, si el hecho se debiera a una simple acción reiterativa de los enzimas, que fueran cortando sucesivamente los enlaces-substrato específicos, no se trataría sino de esclarecer las características particulares químicofísicas de la proteolisis enzimática. Ahora bien, si el trabajo experimental planteado en b) llega a demostrar que la superficie de fisura se escinde en virtud del corte de un único enlace

por la proteinasa (corte que trasciende, en ausencia ya del enzima, a la ruptura de los restantes de la superficie de fisura), el fenómeno podría acercarnos al conocimiento de alguna característica interesante de la estructura íntima de la molécula proteica.

RESUMEN

Los resultados obtenidos empíricamente por diversos autores en la purificación de plasmas y sueros antitóxicos con el empleo de proteinasas parecen indicar que estos enzimas, en determinadas condiciones experimentales, escinden la molécula de seroglobulina en dos porciones que son siempre las mismas. Como nos parece improbable que el corte de un solo enlace peptídico consiga el desdoblamiento de la molécula de esferoproteínas en dos fragmentos independientes, nos sentimos inclinados a admitir la existencia de superficies de fisura preferente frente a la acción del enzima. En el trabajo se exponen los experimentos proyectados para demostrar: 1) la existencia efectiva de tales superficies de fisura; 2) el modo de acción de la proteinasa sobre cada superficie de fisura (bien por cortes independientes sucesivos sobre cada enlace de la superficie, bien por efecto de un primer corte directo que trasciende de modo secundario y en ausencia ya del enzima a la escisión de toda la superficie); 3) si el fenómeno puede considerarse propiedad de la molécula de seroglobulina o propiedad característica de las diversas proteinasas (discusión del concepto constante de reiterabilidad de la acción de las proteinasas), y 4) si la escisión enzimática dirigida es una propiedad exclusiva de las seroglobulinas (o de un tipo de proteínas especial que las incluye) o es una propiedad general de la estructura proteica.

La comunicación señala la trascendencia de los trabajos emprendidos para: 1) establecer la forma más conveniente de llevar a cabo la digestión enzimática de sueros y plasmas con el propósito de concentrar la función anticuerpo, y 2) estudiar la trascendencia que la existencia de tales superficies de fisura pueda presentar para profundizar en el conocimiento de la función y origen biológicos de las seroglobulinas (si la existencia de tales superficies es propiedad especial de las seroglobulinas) o (caso de ser una propiedad proteica general) para profundizar en el conocimiento general de las proteínas.

SUMMARY

The results empirically obtained by several authors in the purification of plasma and antitoxic serums by the application of proteins seem to suggest that these enzymes in certain experimental conditions, produce a fission of the serumglobulin molecule in two parts which are always the same. As it seems not probable that the act of cutting a single peptidic link will succeed in unfolding the molecule of spheroprotein in two independent fractions, we are willing to admit the existence of preferential fissure surfaces directly opposite to enzym action. In the work are shown the planned experiments to demostrate: 1) the actual existence of such fissure surfaces; 2) the mode of action of the proteinase upon every surface link, or as a consequence of a first direct cut deriving secundarily, and in absence of the enzyme to the fission of the whole surface; 3) whether the phenomenon should be considered a quality of the serumglobulin molecule or a distinctive quality of the different proteinases (discussion of the concept of reiterability of the action of proteinases constant); and 4) whether the conducted enzymatic fission is an exclusive quality of the serumglobulins (or of an special protein type including them) or it is a general quality of the proteinic structure.

The rapport emphasizes the importance of the works undertaken to: 1) establish the more convenient form to go ahead with the enzymatic digestion of serums and plasmas in order to concentrate the antibody function, and 2) to study the importance that the existence of such fission can have to deepen in the knowledge of the function and biological origin of the serumglobulins (should the existence of such surfaces be a special quality of serumglobulins) or (should be a general proteinic quality) to deepen in the general knowledge of proteins.

BIBLIOGRAFIA

(1) **F. CORDON** y **A. MARTINEZ.** 1952. **Microb. Espań.**, 5, 53.

(2) **I. A. PARFENTJEV,** pats. norteamers. 2065196 (1936), 2123198 (1938) y 2175090 (1939).

(3) **F. CORDON** y **A. MARTINEZ.** 1954. **Microb. Espań.** En este mismo número. 291-306.

(4) C. G. POPE. 1938. Brit. J. Exp. Path., 19, 245.

(5) A. M. PAPPENHEIMER y E. S. ROBINSON. 1937. J. Immunol., 32, 291; M. L. PETERMANN y A. M. PAPPENHEIMER (citado en (7); M. L. PETERMANN, J. Phys. Chem., 46, 183 (1942); M. L. PETERMANN, J. Biol. Chem., 144, 607 (1942).

(6) C. G. POPE. 1939. Brit. J. Exp. Path., 20, 132, 201.

(7) M. L. PETERMANN y A. M. PAPPENHEIMER. 1941. J. Phys. Chem., 45, 1.

(8) A. J. HARMS. 1948. Bioch. J., 42, 390.

(9) A. GLAUBIGER. 1948. J. Lab. Clin. Med., 33, 757.

(10) J. BOURDILLON. 1944. Arch. Biochem., 5, 385; id., 8, 37 (1945).

(11) G. SANDOR. 1939. C. r. Soc. Biol., 131, 1.224; id., 130, 840 (1939); Bull. Soc. Chim. Biol., 22, 129 (1940).

(12) A. HANSEN. 1948. Acta path. Microbiol. Scand., 25, 460.

INSTITUTO I. B. Y. S.
LABORATORIO DE BIOQUIMICA

ESTUDIOS SOBRE PURIFICACION Y DESANTIGENIZACION ENZIMATICAS DE SUEROS Y PLASMAS ANTITOXICOS

II. ESTUDIO CRITICO CONFIRMADO EXPERIMENTALMENTE DE LAS NOCIONES DE PARFENTJEV SOBRE LA CONCENTRACION ENZIMATICA DE LAS ANTITOXINAS (*)

por
F. Cordón y A. Martínez.

I

CONSIDERACIONES GENERALES

En nuestra comunicación anterior (1) (primera de la serie en que expondremos nuestros trabajos acerca de la purificación y desantigenización enzimáticas de sueros y plasmas antitóxicos) defendemos la opinión de que carece de sentido aplicar proteinasas a la purificación de antitoxinas si el propósito que guía la purificación es concentrar las globulinas portadoras de la función de anticuerpo en su estado o tamaño nativo. Parfentjev, cuyos trabajos empíricos (2) abren la época, hoy en pleno vigor, de la purificación por vía enzimática de antitoxinas, tiene, en cambio, como idea rectora la opinión contraria que se sostiene en la literatura. Por este motivo decidimos contrastar una y otra opinión con los hechos del modo que exponemos a continuación.

Parfentjev digiere el suero antitóxico a pH 4,6, dos días, a 27° C, con pepsina; elimina el precipitado que se separa en el curso de la diges-

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada en Madrid por la Sociedad de Microbiólogos Españoles el día 26 de abril de 1954.

tión (constituído, según él, por euglobulina, etc.), neutraliza el filtrado y lo concentra por ultracentrifugación.

Para purificar el concentrado lo precipita con sulfato amónico que, según él, separa las fracciones digeridas (peptonas, proteosas, etc.) que quedan disueltas del precipitado de material casi intacto que contiene las antitoxinas. Dializa el precipitado activo, que se solubiliza, y separa las porciones activa e inactiva por adsorción selectiva a $Ca_3(PO_4)_2$ (que fija gran parte de las proteínas inactivas, lipoides, pepsina, substancias colorantes, etc.).

Al parecer, Parfentjev funda su procedimiento en la distinta velocidad con que la pepsina digiere las diversas fracciones del plasma; según él, «la albúmina se digiere hasta volverse casi toda eliminable por diálisis, la euglobulina sufre una digestión parcial y lo no digerido precipita en medio ácido, mientras que la pseudoglobulina (donde radican los anticuerpos), si bien sufre también una digestión parcial, conserva la solubilidad de sus trozos intactos». Concretando, según este autor, la pepsina puede actuar como agente de un fraccionamiento selectivo de las proteínas del plasma, primero, por digerir más fácilmente la albúmina que las globulinas, de modo que aquéllas, después de la digestión, pueden separarse totalmente por diálisis, sin pérdida sino de una fracción de las globulinas y, segundo, porque el enzima actúa también de modo distinto sobre las eu y pseudoglobulinas, ya que las primeras, antes de ser degradadas, experimentan una suerte de acción (podemos decir se desnaturalizan) por el fermento, de tal modo que se insolubilizan, mientras que las pseudoglobulinas que sigan sin degradar conservan su solubilidad.

Este trabajo de Parfentjev es fundamental, porque abre el camino de la aplicación de enzimas al enriquecimiento de preparados antitóxicos. Resulta, no obstante, aún hoy, equívoco tanto en su propósito como en la interpretación de la esencia de los procesos que, por primera vez (*), re-

(*) Aunque muy anteriormente O. Imray (3) había patentado un método "para eliminar la albúmina de *antitoxina* y toxinas de origen animal y bacteriano por la acción de fermentos capaces de digerir la albúmina, por ejemplo, fermentos peptonizantes", prescindimos del análisis de esta patente por la siguiente razón: En aquellas fechas los anticuerpos se consideraban como entidades químicas distintas de las albúminas y globulinas de la sangre (la identificación de los anticuerpos con seroglobulinas es muy posterior). Por tanto, resulta muy claro lo erróneo de la suposición teórica en que se basa tal patente: eliminar las proteínas (lo que en la patente se denominaba albúmina) por digestión proteolítica, que se supone no alterará los anticuerpos, considerados de naturaleza no proteica.

comienda. Es indispensable, por consiguiente, someterlo a una atenta consideración crítica.

Tal como lo expone Parfentjev, su método puede equipararse a los de fraccionamiento por salado, ya que al parecer, por la digestión péptica pretende separar, de las proteínas del suero, una fracción en que estén contenidas de modo preferente las antitoxinas en estado nativo. Para que el método de Parfentjev supusiera una ventaja sobre el de salado, sería necesario que la fracción que deja sin atacar ni desnaturalizar la pepsina correspondiera más estrictamente a la fracción de antitoxinas puras que la fracción compleja de las pseudoglobulinas (así se denomina, en realidad, una fracción compleja establecida de modo empírico precisamente por salado). A priori, parece que si lo que se persiguiera realmente con la aplicación de pepsina fuera este propósito, los resultados no podrían ser satisfactorios. En efecto, se trataría de beneficiar entre una mezcla de varias substancias (albúminas, globulinas α, β y γ, fibrinógeno, factores del complemento, enzimas fibrinolíticos, protrombina, isoaglutininas, hipertensinógeno, mucoglobulinas, etc.), todas substratos de la pepsina, una de ellas y precisamente por la aplicación de este efecto común sobre todas; la consecuencia lógica parece ser que la aplicación del enzima no habría de conseguir sino complicar el problema, tanto por destruir parte del principio activo como por aumentar la heterogeneidad de la mezcla que desea fraccionarse. Para que la digestión péptica compensara estos inconvenientes y alcanzara a mejorar los resultados obtenidos por el salado, persiguiendo el mismo propósito que éste, sería, al parecer, necesario que se cumpliera la condición siguiente: que dentro de la mezcla de substancias que constituyen la pseudoglobulina, un grupo apreciablemente más restringido de ellas, en el que estuvieran incluídas las antitoxinas, poseyera una especial resistencia al efecto de la pepsina. Podemos decir que, aunque en esta interpretación incurran más o menos explícitamente algunos autores, no parece de ningún modo probable; en nuestra opinión, esta idea equivocada procede de una observación real, a saber: que los sueros antitóxicos se digieren por la pepsina con alguna mayor lentitud que los normales. Ahora bien, la causa más probable de esta diferencia de comportamiento, en opinión de Schultze (4) (véase pág. 294), que ha estudiado detenidamente el problema comparando suero equino normal con suero equino antidiftérico, consiste, sencillamente, en que el primero posee mayor

proporción de globulinas con respecto a albúminas que el segundo y aquéllas se digieren más lentamente que éstas por dicho enzima. En definitiva, si lo que se pretende no es sino separar un determinado tipo de moléculas proteicas en en el estado en que preexistían en el suero mezclados con la menor cantidad posible de lastre, no parece existir ninguna razón que permita esperar que la digestión péptica haya de sustituir con ventaja la insolubilización fraccionada por salado.

II

ESTUDIO DETALLADO Y CONFIRMACION EXPERIMENTAL

Para puntualizar mejor el problema de las diferencias de digestibilidad por la pepsina de sueros normales y antitóxicos a que antes se hizo referencia, hagamos algunas consideraciones incidentales. A priori, el hecho, bien estudiado por Schultze (4) y confirmado por nosotros (*),

(*) Schultze compara la digestibilidad por la pepsina de sueros equinos antitóxicos y de sueros normales y aprecia que los primeros, en determinadas condiciones, se digieren con menos rapidez que los segundos. De sus resultados el autor deduce que la resistencia a ser desdoblados por la pepsina no está en relación con la cantidad de antitoxinas que contiene el suero, ni con la de substancias nitrogenadas no proteicas, y sí con la proporción globulina-albúmina de los sueros.

El trabajo de Schultze está bien ordenado, es concienzudo y recoge el examen de numerosos sueros. Sin embargo, al enjuiciar sus resultados debe tenerse en cuenta: 1, que el método seguido para determinar la profundidad de la proteolisis (por la cantidad de proteína poco digerida determinada nefelométricamente por la adición de ácido sulfosalicílico) no refleja directamente ésta, como lo hace la determinación de los incrementos de los grupos carboxilo y amino libres; por tanto, aunque ofrece la ventaja de ser cómodo, presenta el inconveniente de que la fracción de material proteico que precipita por el ácido sulfosalicílico puede ser cuantitativamente distinta para una misma profundidad de digestión, o cuantitativamente análoga para digestiones distintas (según sea la naturaleza del substrato); 2. que las diferencias entre la digestibilidad de los sueros observados por Schultze son pequeñas y, en ocasiones, al parecer, no totalmente convincentes (véase Tabla X de su trabajo). Nótese también que estas diferencias desaparecen al digerir en líquidos que contengan el substrato y el enzima a concentraciones más altas que las que el autor emplea o que estén puestos a un pH próximo al óptimo de acción de la pepsina.

A pesar de estas objeciones de procedimiento, nuestra opinión, fundada en experimentos propios que luego se expondrán, es que las conclusiones deducidas por Schultze son correctas y, por tanto, que las diferencias se deben a que la sero-

no puede deberse, en nuestra opinión, sino a una de estas tres causas: 1.ª, a la aparición (o incremento) en el suero inmune de un inhibidor del enzima; 2.ª, a la aparición de globulinas especiales (las antitoxinas mismas) dotadas de mayor resistencia a la pepsina que las normales, y 3.ª, a la alteración de las proporciones entre albúminas y globulinas a consecuencia de la inmunización, con el efecto de un aumento relativo de las más resistentes al fermento (globulinas). Consideraremos a continuación cuál de estas causas sea la más probable.

1.ª Como hemos dicho, la primera causa posible de la menor digestibilidad péptica de un plasma equino antitóxico con respecto a uno normal puede ser la aparición (o incremento) en el plasma del animal dador, como consecuencia de la hiperinmunización (*), de un inhibidor de la pepsina, entendiendo por éste una sustancia que no sufra como substrato la acción del enzima, pero que impida en mayor o menor grado su efecto sobre substratos apropiados. Para excluir esta posibilidad, a priori muy poco verosímil y carente de congruencia biológica, se efectuaron los experimentos siguientes:

Se compararon entre sí la digestibilidad de las siguientes muestras: ensayo 1, plasma antitóxico, plasma normal y plasma normal + residuo no proteico procedente de plasma antitóxico; ensayo 2, caseína, caseína + plasma antitóxico y caseína + plasma normal, y ensayo 3, caseína, caseína + residuo no proteico procedente de plasma antitóxico, caseína + residuo no proteico procedente de plasma normal, y mezcla de residuos no proteicos procedentes de plasma normal y de plasma antitóxico.

(En todos estos ensayos se determinó la marcha de la digestión por el incremento de grupos aminos según el método de Lindenström-Lang (5); se utilizaron quince partes de pepsina —título 1:10.000— por cien partes de substrato; la digestión se efectuó siempre a 37° y pH 3,1; las determinaciones de los grupos amino se efectuaron a las 0, 1/2, 1, 2, y

albúmina se digiere con mayor facilidad que la seroglobulina y a que los sueros antitóxicos obtenidos por hiperinmunización poseen mayor proporción de globulinas que los sueros normales de la misma especie. Ahora bien, la diferencia de digestibilidad es, en general, tan pequeña que, en ocasiones, se invierten los términos, para lo cual bastará, probablemente, que, en el curso del almacenamiento, las proteínas del suero antitóxico hayan experimentado una desnaturalización más profunda o de otro tipo que las del suero nativo testigo.

(*) Véase nota al pie de la página 301.

4 horas. Para todas las mezclas se mantuvo constante la concentración total de proteínas-substrato —1 por 100— y, en las que contienen dos substratos proteicos éstos se mezclaron a partes iguales. El residuo no proteico se preparó por la precipitación del correspondiente plasma en medio alcohólico al 70 por 100. La precipitación se efectuó añadiendo a través de un capilar al plasma enfriado y sometido a intensa agitación alcohol a —20° C., primero de 30 por 100 y después de concentración creciente hasta llegar a un líquido de la concentración final dicha; la proteína se separó por centrifugación y el líquido, que no precipita por ácido tricloroacético, se concentró hasta el volumen inicial.

En el ensayo 1 se observó una digestión prácticamente igual en las tres mezclas. En el ensayo 2, si bien la caseína sola se digirió algo más rápidamente que las dos mezclas a partes iguales de caseína y plasma (antitóxico o normal), el descenso, que —naturalmente— no cabe atribuir sino a la distinta índole del substrato, es semejante con uno y otro plasma. El ensayo 3 demuestra que la adición, tanto de uno como de otro residuo, no perturba sensiblemente la velocidad de digestión de la caseína. (De las dos veces que efectuamos este ensayo en una se observó que la adición, tanto de uno como de otro residuo, disminuía ligeramente y con igual intensidad la velocidad de digestión de la caseína; en la otra, el efecto, también ligero, fué el contrario; hay que atribuir el ligero efecto de signo, unas veces positivo y otras negativo, a alteraciones del estado físico del substrato —caseína muy cerca de su punto isoeléctrico—, pero rechazar todo efecto inhibidor ni activador.) En definitiva, los resultados de los tres ensayos (que confirman los de los experimentos propios anteriores) permiten afirmar que la mayor resistencia de los sueros antitóxicos a la acción de la pepsina no se debe a la aparición ni al incremento en el plasma del animal sometido a hiperinmunización, de un inhibidor de la pepsina. Queda también demostrado que el suero equino normal tampoco inhibe dicha acción fermentativa.

2.ª Como es sabido que por la inmunización aparecen seroglobulinas nuevas (a saber, los anticuerpos específicos para el antígeno con que se inmuniza) pudiera opinarse que el anticuerpo creado en la hiperinmunización de los caballos que nos ocupa, esto es, la antitoxina diftérica, posee una resistencia considerablemente mayor a ser digerida por la pepsina que el conjunto de las globulinas. A priori esta propiedad es muy poco probable. En efecto, téngase en cuenta, ante todo, que las anti-

toxinas no constituyen un tipo especial de anticuerpos (en realidad el criterio de clasificación de los anticuerpos —precipitinas, aglutininas, antitoxinas, citolisinas, etc.— no responde a características de su propia naturaleza, sino meramente a la manifestación exterior de su reacción con los antígenos correspondientes, manifestación que, en cada caso, depende de las propiedades e incluso del estado físico del antígeno y no del anticuerpo); las antitoxinas, en efecto, como se sabe desde los trabajos de Ramón (6), en condiciones apropiadas, se comportan como precipitinas frente al antígeno correspondiente; además, opinamos que, dado el estado actual de nuestros conocimientos, puede afirmarse con seguridad que las antitoxinas habrán de proceder de una conformación de las globulinas normales que se produzca en el tipo de células de que proceden éstas y en virtud de un proceso común a la formación de los anticuerpos inmunes (e incluso nos atreveríamos a decir que a la formación de los naturales); por último, téngase en cuenta que ni el antígeno completo ni ninguna fracción de él forma parte, en substancia, de la globulina inmune. Por tanto, parece lógico sustituir la pregunta de si la antitoxina diftérica (*) posee una resistencia considerablemente mayor a ser digerida por la pepsina que el conjunto de las globulinas, por la cuestión más general de si es de esperar que la transformación de la globulina normal en inmune haya de modificar su digestibilidad por la pepsina. Esta pregunta parece, a priori, que puede contestarse de modo negativo por las consideraciones siguientes:

a) En el estado actual de las investigaciones inmunológicas nos parece muy difícil precisar el concepto de globulina normal por oposición al concepto de globulina inmune (o, con más generalidad, al de globulina dotada de afinidad específica para determinada substancia) y conside-

(*) O, en general, todas las antitoxinas. Recordemos que Parfentjev considera que tanto su método como cualquier otro de purificar *una* antitoxina es aplicable a todas las *demás* (el autor especifica las de la difteria, tétanos, estreptococo hemolítico, estafilococo, perfringens, vibrión séptico, oedematiens, histolítico, Sordelli, botulínica tipo I y II y análogas). Parfentjev continúa en el error —hoy en general superado— de considerar que dentro de los anticuerpos las antitoxinas constituyen un grupo homogéneo por su propia naturaleza, cuando, en realidad, entre una antitoxina y otra no existe ningún carácter substancial común que no pueda darse entre una antitoxina y cualquier otro anticuerpo. Su *efecto* común (que dió origen al nombre de antitoxina) radica meramente en una propiedad común a sus antígenos (toxinas) y no justifica la postulación de otras propiedades comunes y exclusivas de ellas, que sean independientes de los antígenos. (Nótese que los antígenos no obran como tales por la toxicidad.)

ramos imposible diferenciar experimentalmente y separar las dos clases de globulinas. Podemos aducir que el conjunto de seroglobulinas de un animal contendrá una mezcla de globulinas dotadas de especificidades muy diversas; cada uno de los determinantes de los procesos de inmunización que sigan en marcha en el momento de la sangría o (dada la vida media del anticuerpo) lo hayan estado dentro de los veinte días anteriores a ella, contará con un número mayor o menor de globulinas dotadas con actividad específica para él; podemos admitir como muy probable que exista, además, una fracción de globulinas (o, más precisamente, de las globulinas transformables en anticuerpos) que no esté marcada por su afinidad específica para ningún determinante de ningún antígeno. Ahora bien, es innecesario decir que no poseemos ninguna indicación acerca de la cuantía de esta fracción carente de afinidad específica, ya que la adquisición de afinidad no confiere ninguna característica física ni química general (sino la particular de la afinidad específica misma) y, por otra parte, es imposible agotar una a una las fracciones de globulinas marcadas por las distintas especificidades, por desconocerse, prácticamente en absoluto, la naturaleza de los procesos de inmunización endógenos y exógenos que en un momento determinado puedan estar en marcha en un organismo animal. Y lo anterior vale refiriéndonos al estado en que vierten a la sangre las globulinas desde las células productoras de ellas; a fortiori, téngase en cuenta que desconocemos por completo la historia intracelular de la globulina, no siendo de ningún modo inverosímil que una molécula de globulina que intracelularmente recibió una configuración que le confirió una especificidad determinada, pueda perderla intracelularmente, quedando exenta de especificidad y, tal vez, incluso volver a recibir en la célula una especificidad nueva. En este caso ¿habríamos de admitir que con la afinidad específica se perdería simultáneamente la resistencia a la acción de la pepsina o, al contrario, que solamente las globulinas «vírgenes», por decirlo así, son las lábiles ante el fermento? Por otra parte, esta globulina que nunca recibió una afinidad especial, ¿debe considerarse «normal» en sentido estadístico o, por el contrario, como parece muy probable, lo normal sea que adquiera en breve plazo una afinidad especial y que esta adquisición esté ligada a la actividad funcional normal de las globulinas en sus células de origen? Como se desprende de las consideraciones anteriores, es muy poco probable que dentro de las globulinas los anticuerpos representen algo especial;

por otra parte, también se deduce que es difícil resolver experimentalmente el problema, pues si bien es cierto que, teóricamente, puede aislarse un anticuerpo dotado de determinada especificidad, es imposible, en cambio, obtener un término de comparación para su digestibilidad; a saber, la digestibilidad de globulinas carentes de toda especificidad inmunológica (y aun menos la de globulinas que hayan carecido de tales especificidades desde su origen en la célula madre) y que, no obstante, pertenezcan a las transformables en anticuerpos.

b) En abono de la opinión de que la transformación de la globulina normal en inmune no cambia la digestibilidad por pepsina habla también el hecho, bien establecido, de que la adquisición de una especificidad determinada no modifica de modo apreciable las propiedades físicas, químicas ni serológicas de las globulinas; con respecto a estas últimas propiedades, recordemos que, como es sabido, si se inmunizan unos conejos con globulinas normales de una especie animal y otros conejos con globulinas anticuerpos para determinado antígeno procedente de la misma especie que las normales, los dos anticuerpos de conejo obtenidos reaccionan indistintamente y con igual intensidad con ambas globulinas, y que, en cambio, no manifiesten ningún parentesco serológico dos sueros de conejos obtenidos vacunando sendos grupos de estos animales con anticuerpos para el mismo antígeno, pero procedentes de animales de distinta especie. Es de conocimiento general la sensibilidad con que se acusan en la especificidad de los anticuerpos pequeñas diferencias de estructura existentes entre moléculas antigénicas por lo demás tan semejantes que el criterio serológico es el único que permite distinguirlas; parece, pues, en contradicción con todos los hechos recogidos por la investigación inmunológica admitir que pudiera producirse una alteración tan profunda de la molécula de globulina que modificara esencialmente su digestibilidad por la pepsina, sin que la alteración se reflejara en absoluto en la especificidad de la globulina como antígeno.

A pesar de las consideraciones anteriores y de la dificultad objetiva del problema expuesto anteriormente, se intentó confirmar la impresión de que la menor digestibilidad de los sueros antitóxicos con respecto a los normales no se debe a una resistencia especial de las antitoxinas. Para decidir la cuestión se planeó el experimento siguiente:

Se compararon las digestibilidades de globulina y de albúmina procedentes de suero equino antidiftérico.

Para obtener las dos fracciones proteicas se procedió de modo rigurosamente igual con los dos sueros, que se habían obtenido recientemente y se conservaron hasta el momento de ser trabajados en nevera a —20°, sin adición de conservador. Para preparar las fracciones se recurrió al método de T. L. McMeekin (7), que utiliza sulfato amónico como agente del fraccionamiento, pero toma especiales precauciones para evitar toda desnaturalización (*). Como en otros experimentos nuestros, se apreció la profundidad de las digestiones (a los tiempos 0,1/2, 1, 2 y 4 horas) por el incremento de los grupos amino mediante la técnica de Linderström-Lang; se aplican 15 partes de pepsina, de título 1:10.000, por 100 partes de substrato; las digestiones se efectuaron siempre a 37° C. y pH 4,5 (que, según Schultze, es el más favorable para apreciar la distinta digestibilidad de los sueros); en todas las mezclas la proteína-substrato se disolvió en una concentración del 0,5 por 100.

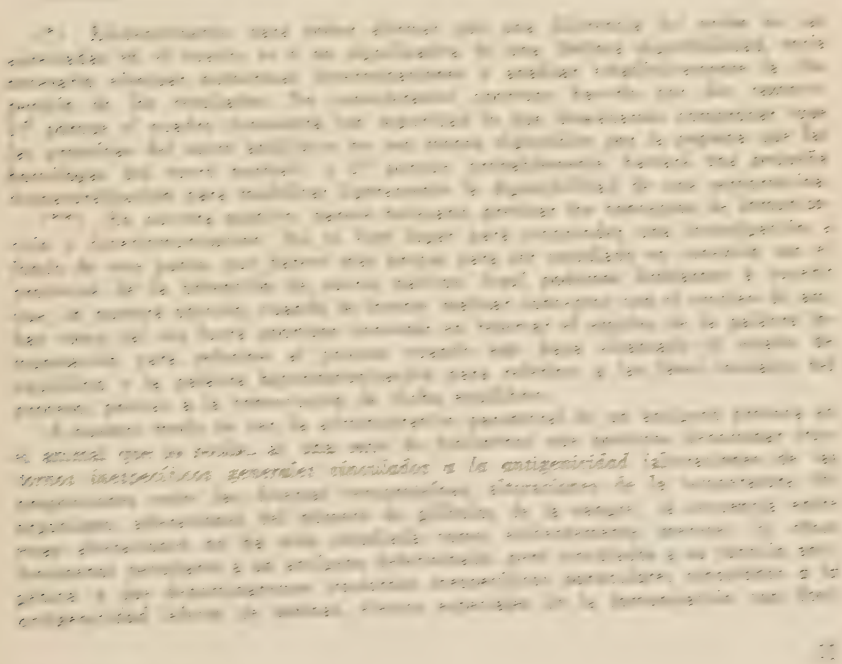
Resumimos los resultados de la marcha de la digestión:

Proteína-substrato	Horas de digestión	Δ N amínico (en mg.) (promedios de dos determinaciones)
Albúmina de suero normal	1/2	0,035
	1	0,14
	2	0,14
	4	0,27
Globulina de suero normal	1/2	0,00
	1	0,035
	2	0,035
	4	0,105
Albúmina de suero antitóxico	1/2	0,08
	1	0,15
	2	0,18
	4	0,355
Globulina de suero antitóxico	1/2	0,00
	1	0,08
	2	0,08
	4	0,13

(*) El autor incorpora la disolución de sulfato amónico por diálisis a través de membranas giratorias. Hemos sustituído este modo de operar, lento y complicado, por la adición a través de un capilar de disoluciones de sulfato amónico de molaridad creciente (molar, 2-molar, 4-molar). Las fracciones de globulinas y de albúmina precipitadas, no se sometieron a ulterior purificación, como hace dicho autor. Al dializar contra agua corriente ambas fracciones, se produce un abundante precipitado que se redisuelve casi totalmente al añadir el NaCl calculado para establecer una concentración del 0,85 por 100.

Como conclusiones, se observa: 1, que tanto la albúmina de suero normal como la de suero anafórico se digiere mucho más rápidamente que las globulinas de una y otra procedencia; 2, que de acuerdo con lo previsto, la digestibilidad de la globulina de suero anafórico es muy semejante a la de la globulina de suero normal, y que lo mismo puede decirse de las dos albúminas, y 3, que la pequeña diferencia que se observa entre las dos globulinas y entre las dos albúminas, porque de un orden tal que puede no ser significativo. * de diferente digestibilidad, habría de tener, más bien, la albúmina del suero anafórico, mayor facilidad los componentes del suero anafórico. En todo caso, y como resumen, puede afirmarse, seguramente, que la globulina del suero anafórico no ofrece mayor resistencia que las del suero normal a ser digeridas por la pepsina.

3.ª Queda, pues, como única causa posible para explicar la menor digestibilidad física de un suero anafórico con respecto a uno normal, la tercera de las consideradas: a saber, que en los sueros anafilácticos (hiperinmunizados **) con el antígeno correspondiente está desarrollada la proporción entre las diversas seroproteínas en el sentido de un enriquecimiento relativo de aquellas a las que la pepsina digiere con menos



rapidez. En nuestra opinión, parecen hablar concluyentemente en favor de esta hipótesis los dos hechos siguientes, bien confirmados: 1, que, a consecuencia de una hiperinmunización, se modifique la proporción entre las proteínas del suero en el sentido de aumentar el contenido de globulinas a expensas del de albúminas (*), y 2, que, como puede verse, por ejemplo, en el cuadro anterior, las albúminas se digieran con más rapidez que las seroglobulinas.

En efecto, si se modifica la proporción entre globulina y albúmina, las mezclas ofrecen una escala de digestibilidad creciente con el contenido de albúmina. Véase, como ejemplo, los resultados del siguiente experimento propio:

Se efectuaron dos ensayos en los que se compararon las digestibilidades de los siguientes productos: ensayo n.º 1, suero equino normal, suero equino normal enriquecido en la propia albúmina y suero equina normal enriquecido en la propia globulina, y ensayo n.º 2, suero equino antidiftérico, suero equino antidiftérico enriquecido en la propia albúmina y suero equino antidiftérico enriquecido en la propia globulina.

Suponemos que un suero poseerá, como término medio, de acuerdo con los datos analíticos de la literatura (8, 9), 49 partes de globulinas totales y 46 de albúminas por 100 de proteínas; partiendo de este dato, se añade a uno y otro suero la cantidad calculada de albúmina para que su contenido de ella se haga 1,5 veces mayor; lo mismo se hace con la globulina. Estos productos se obtuvieron por el método de McMeekin, como se expuso en la página 300. Las seis mezclas de uno u otro ensayo poseen igual contenido de proteínas totales (0,05 por 100). Se digiere a 37º, a pH 4,5 con 15 partes de pepsina de título 1:10.000, por 100 partes de substrato.

---

altas de ciertos antígenos) y, por último, c) los fenómenos específicos de *la inmunización* (aparición de anticuerpos —globulinas inmunes— con afinidad específica para el antígeno, creación de anafilaxia para este antígeno).

En la hiperinmunización juegan papel destacado los fenómenos a) y b) y la creación de los fenómenos específicos c). En la inmunización han remitido los fenómenos a) y b) y se mantienen a nivel constante los fenómenos específicos c).

(*) Consideramos que este hecho está perfectamente establecido por la vasta literatura concerniente a los desplazamientos cuantitativos que experimentan las seroproteínas durante los procesos de inmunización. En nuestra opinión, se desconoce la secuencia de fenómenos entre el proceso primario de la inmunización y dos consecuencias visibles de él: el trastorno del espectro electroforético del suero sanguíneo y la adquisición por determinadas globulinas de una capacidad de reacción específica. Las interpretaciones actuales parecen inconsistentes y afectadas del vicio teleológico que sufre la concepción vigente de la inmunidad.

Los resultados se recogen en el siguiente cuadro (los incrementos de N amínico se determinaron, a los tiempos consignados, por el método de Linderström-Lang):

Substrato proteico	Horas de digestión	Δ N amínico (en mg.) (promedio de dos determinaciones
Suero equino normal	1/2	0.095
	1	0.145
	2	0.165
	4	0.20
Suero equino normal enriquecido en albúmina.	1/2	0.09
	1	0.10
	2	0.20
	4	0.21
Suero equino normal enriquecido en globulinas	1/2	0.05
	1	0.05
	2	0.11
	4	0.14
Suero equino antidiftérico	1/2	0.07
	1	0.08
	2	0.08
	4	0.23
Suero equino antidiftérico enriquecido en albúmina.	1/2	0.11
	1	0.135
	2	0.135
	4	0.215
Suero equino antidiftérico enriquecido en globulina.	1/2	0,07
	1	0.07
	2	0.09
	4	0.18

Del examen del cuadro puede deducirse la conclusión de que, en efecto, el enriquecimiento relativo de un suero en globulinas provoca una disminución apreciable de la digestibilidad. El orden de la cuantía de esta disminución, indudablemente, es pequeño, como era de esperar dada la corta diferencia de digestibilidad que parecía Schultze en sus numerosos ensayos.

En resumen, la investigación de la causa de la distinta digestibilidad de los sueros normales y antitóxicos parece llevar a la conclusión de que la pequeña diferencia observada se debe a que los segundos (más por el proceso de hiperinmunización que por el contenido real de anticuerpos

antitóxicos) poseen mayor proporción de globulinas con respecto a albúminas que los segundos. En cambio, al parecer, puede afirmarse que las globulinas-anticuerpo se digieren con igual facilidad que las normales (con la salvedad de la dificultad de concretar el concepto de estas últimas).

III

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Del examen crítico de las nociones de Parfentjev podemos sentar la conclusión de que carece de sentido la aplicación de pepsina (o, en general, de una proteinasa) para separar selectivamente las moléculas de globulina en estado o tamaño nativo con función de anticuerpo de las restantes proteínas del plasma sanguíneo. Persiguiendo esta finalidad se consiguen mejores resultados por la aplicación de otros métodos de aislamiento de diversos grupos de seroglobulinas (fraccionamiento por salado, por diálisis, por electroforesis, etc.) que se fundan en características físicoquímicas de las distintas moléculas nativas, de mucho más valor para la separación mutua que el comportamiento en cuanto a substratos de la pepsina. Parece, pues, indudable que por la aplicación de dichos métodos ha de conseguirse con cierta facilidad una fracción de seroproteínas más homogénea y con mayor proporción de anticuerpos en estado nativo que el que pudiera lograrse por fraccionamiento aplicando pepsina.

La conclusión anterior no excluye, sin embargo, la aplicación de pepsina (o, en general, de proteinasas) a la concentración de sueros antitóxicos (o, en general, de sueros inmunes), aplicación cuyos resultados parecen sancionados por la experiencia de numerosos autores. Ahora bien, para conseguir por digestión péptica unos concentrados de sueros antitóxicos de mejor calidad que los obtenidos por otros métodos ha de variarse la finalidad perseguida por la digestión péptica. Esto puede hacerse en dos sentidos: primero, persiguiendo la concentración no de moléculas de anticuerpo nativas, sino de la función anticuerpo adscrita a trozos de la molécula de globulina inmune resultantes de la digestión y, segundo, intentando eliminar en el concentrado el carácter de anafilactógeno y conservar en él, en lo posible, la actividad de anticuerpo. Como veremos, a priori, parece posible conseguir resultados interesantes en

una y otra dirección; pero, además, como se discute en nuestra comunicación anterior (1), la discusión de las condiciones necesarias para lograrlos conduce al planteamiento de problemas de interés teórico general.

CONCLUSIONS AND PROSPECTS

From the critical examination of Parfentjev's views we can conclude that it is meaningless to apply pepsin (or, generally speaking, a proteinase) to isolate selectively, in natural state or size, the globulin molecules with antibody function from the remaining proteins of the blood plasma. Seeking this end, better results are achieved applying other isolating methods of various serumglobulin groups (fractioning by salting out, by dialysis, by electrophoresis, etc.) based in physical and chemical characteristics of the different natural molecules, of a larger value for mutual segregation than the behaviour as pepsin substratum. It appears, then, unquestionable, that by the applying of such methods can be obtained with a certain facility a fraction of native serumproteins more homogeneous and with a greater proportion of antibody that what could be attained through fractioning applying pepsin.

Former conclusion does not exclude, nevertheless, the aplication of pepsin (or, generally speaking, of proteinases) to the concentration of antitoxic serums (or, in general, of immune serums); the results of such application being guaranteed by the experience of many authors. Then, to obtain by peptic digestion better quality antitoxic serum concentrates than those secured through other methods, the ends pursued by peptic digestion should be changed. This can be made in two ways: f i r s t l y, trying to obtain concentration, not of antibody molecules in natural condition, but of the antibody function appointed to parts of the immune globulin molecule resulting of digestion, and s e c o n d l y, trying to eliminate in the concentrate the character of anaphylactogenous and preserving in it, if possible, antibody activity. As we shall see, it seems possible a priori obtaining interesting results in one or the other direction; but, further, as discussed in our former rapport (1), the discussion of the necessary conditions to achieve them leads to the planning of problems of a general theoretical interest.

BIBLIOGRAFIA

(1) F. CORDON y A. MARTINEZ.—1954. Microb. Españ. En este mismo número, págs. 265-290.

(2) I. A. PARFENTJEV, pats. norteamers. 2065196 (1936), 2123198 (1938), 2175090 (1939).

(3) O. IMRAY, pat. a. 18340 (1902).

(4) H. E. SCHULTZE.—1940. Biochem. Z., 305, 196.

(5) K. LINDERSTROM-LANG.—1927. Ztschr. Physiol. Chem., 173, 32.

(6) G. RAMON.—1922. C. r. Soc. Biol. París, 86, 711.

(7) T. L. McMEEKIN.—1940. J. Am. Chem. Soc., 62, 3.393.

(8) E. J. COHN, T. L. McMEEKIN, J. L. ONCLEY, J. M. NEWELL y W. L. HUGHES.—1940. J. Am. Chem. Soc., 62, 3.386.

(9) E. L. SMITH y T. D. GERLOUGH.—1947. J. Biol. Chem., 167, 679.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA

FIJACIONES DE COMPLEMENTO ENTRE SUEROS DE CABALLOS CON SINDROME PARAPLEGICO Y ANTIGENOS DE ENCEFALITIS ESTE Y OESTE AMERICANAS (*)

por
Eduardo Gallardo Martínez y Angel P. García Gancedo.

En el mes de febrero del corriente año se recibieron en estos laboratorios diez tubos de sangres de caballos para que con sus sueros se realizasen fijaciones de complemento frente a los antígenos de las encefalitis equinas tipo Este y Oeste de América del Norte.

Retirados los sueros de las sangres remitidas con las máximas precauciones asépticas, y comprobada su esterilidad bacteriana por siembras en caldo común y agar sangre, se repartieron los sueros en pequeños tubos conteniendo un c. c., para conservarlos almacenados en termos con hielo seco repuesto diariamente.

Para la titulación de cada uno de los sueros nos ajustamos a la técnica seguida en los laboratorios de la Fundación Hooper de la Universidad de California, centro donde se practican diariamente numerosas fijaciones de complemento con sueros de procesos encefalomielíticos humanos y animales y antígenos de distintos tipos, con arreglo a la siguiente pauta: En una serie de tubos se colocan diluciones de suero (previamente inactivado) (**) de 1/4 a 1/256 en volumen de 0,20 c. c.; seguidamente

(*). Trabajo recibido en noviembre de 1954.

(**) Los sueros estudiados por nosotros se inactivaron durante media hora a 56° C.

se añade a cada tubo 0,20 c. c. de complemento diluído según la titulación que dé, y que contenga dos unidades, y 0,20 c. c. de la dilución de antígeno. Agitadas las gradillas se colocan en fresquera a temperatura de 4 a 8 grados C., donde permanecerán de dieciséis a dieciocho horas. Todos los componentes de esta parte de la reacción se mantendrán fríos durante las manipulaciones.

Separadas las gradillas de la fresquera a la mañana siguiente, se incuba el contenido de los tubos durante media hora en baño maría a 37 grados C., y quince minutos antes de terminar la incubación, se prepara el sistema hemolítico con partes iguales de una suspensión de eritrocitos de carnero lavados al 2 por 100 y una dilución de hemolisina que contenga dos unidades hemolíticas. De esta mezcla se añade a cada tubo 0,40 c. c. y después de otra media hora de incubación a 37 grados C. se procede a leer los resultados, que serán anotados con los números 4, 3, 2, 1, y el signo $\pm$, considerando como título del suero el que dé 2 ó más fijación con la dilución más alta.

Las fijaciones de complemento afectuadas con esta técnica, son más sensibles que las de incubación a 37 grados C., y el volumen de 1 c. c. por tubo en que se realizan supone tal economía en sueros y antígenos, que hace posible en muchos casos repetir la reacción si alguno de los elementos que la integran no respondiese a completa satisfacción. Los posibles errores se evitan practicando la reacción con toda clase de testigos. Nosotros pusimos siempre controles de suero problema, suero normal de caballo, sueros hiperinmunes de cobayo, antígeno virulento de cerebro de ratón y antígeno de cerebro de ratón normal.

Los resultados obtenidos, como puede verse en los cuadros correspondientes, demuestran: Que los sueros 1 - 2 - 3 - 5 - 6 - 7 - 8 y 10, de más de diez días de enfermedad, dieron fijaciones de buena intensidad con los dos antígenos; que el suero 9 de diez días de enfermedad, sólo dió una débil fijación con los dos antígenos; y que el suero 4 de cinco días de enfermedad, no dió la más mínima fijación con ninguno de los antígenos utilizados. Igualmente puede apreciarse examinando detenidamente los cuadros: que las fijaciones más intensas corresponden a las obtenidas con el antígeno Este, y que, asimismo, las fijaciones con las diluciones más altas de suero corresponden igualmente a las efectuadas con el referido antígeno, a pesar de ser utilizado en la dilución 1/8 en los sueros 1 - 2 - 3 - 5 y 7.

SUERO DEL CABALLO NÚM. 1.

Sangre extraída a los treinta días de enfermedad. Fijación con antígeno Este.

Suero al ...	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antígeno al.	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8
Resultados ...	4	4	3	1	0	0	0

Título del suero: 1/32.

Fijación con antígeno Oeste.

Suero al ...	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antígeno al.	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Resultados ...	3	2	1	0	0	0	0

Título del suero: 1/8.

SUERO DEL CABALLO NÚM. 2.

Sangre extraída a los diecisiete días de enfermedad. Fijación con antígeno Este.

Suero al ...	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antígeno al.	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8
Resultados ...	2	1	±	0	0	0	0

Título del suero: 1/8.

Fijación con antígeno Oeste.

Suero al ...	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antígeno al.	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Resultados ...	1	±	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

SUERO DEL CABALLO NÚM. 3.

Sangre extraída a los diecisiete días de enfermedad. Fijación con antígeno Este.

Suero al ...	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antígeno al.	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8
Resultados ...	2	1	±	0	0	0	0

Título del suero: 1/4.

Fijación con antígeno Oeste.

Suero al ...	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antígeno al.	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Resultados ...	1	±	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

SUERO DEL CABALLO NÚM. 4.

Sangre extraída a los cinco días de enfermedad. Fijación con antígeno Este.

Suero al ...	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antígeno al.	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8
Resultados ...	0	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

Fijación con antígeno Oeste.

Suero al ...	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antígeno al.	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Resultados ...	0	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

SUERO DEL CABALLO NÚM. 5.

Sangre extraída a los veinticinco días de enfermedad. Fijación con antígeno Este.

Suero al ...	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antígeno al.	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8
Resultados ...	2	1	±	0	0	0	0

Título del suero: 1/8.

Fijación con antígeno Oeste.

Suero al ...	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antígeno al.	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Resultados ...	1	±	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

SUERO DEL CABALLO NÚM. 6.

Sangre extraída a los veinticinco días de enfermedad. Fijación con antígeno Este.

Suero al ...	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antígeno al.	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Resultados ...	4	3	3	2	1	±	0

Título del suero: 1/32.

Fijación con antígeno Oeste.

Suero al ...	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antígeno al.	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Resultados ...	4	3	2	1	±	0	0

Título del suero: 1/16.

SUERO DEL CABALLO NÚM. 7.

Sangre extraída a los veinticinco días de enfermedad. Fijación con antígeno Este.

Suero al ...	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antígeno al.	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8
Resultados ...	3	2	±	0	0	0	0

Título del suero: 1/8.

Fijación con antígeno Oeste.

Suero al ...	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antígeno al.	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Resultados ...	3	1	0	0	0	0	0

Título del suero: 1/4.

SUERO DEL CABALLO NÚM. 8.

Sangre extraída a los treinta días de enfermedad. Fijación con antígeno Este.

Suero al ...	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antígeno al.	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Resultados ...	4	4	2	2	1	±	±

Título del suero: 1/32.

Fijación con antígeno Oeste.

Suero al ...	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antígeno al.	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Resultados ...	4	3	2	1	±	0	0

Título del suero: 1/16.

SUERO DE LA YEGUA NÚM. 9.

Sangre extraída a los diez días de enfermedad. Fijación con antígeno Este.

Suero al ...	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antígeno al.	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Resultados ...	1	±	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

Fijación con antígeno Oeste.

Suero al ...	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antígeno al.	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Resultados ...	1	0	0	0	0	0	0

Título del suero: 0.

SUERO DEL CABALLO NÚM. 10.

Sangre extraída a los treinta y cuatro días de enfermedad. Fijación con antígeno Este.

Suero al ...	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antígeno al.	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Resultados ...	4	4	3	2	2	1	±

Título del suero: 1/64.

Fijación con antígeno Oeste.

Suero al ...	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Antígeno al.	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
Resultados ...	4	3	2	1	0	0	0

Título del suero: 1/16.

CONTROLES

Suero al	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Control suero problema sin antígeno	0	0	0	0	0	0	0
Control suero normal sin antígeno	0	0	0	0	0	0	0
Control suero normal con antígeno	0	0	0	0	0	0	0
Control suero hiperinmune Este y antígeno Este	3	2	1	1	±	0	0
Control suero hiperinmune Oeste y antígeno Oeste ...	3	2	1	±	0	0	0
Control suero hiperinmune Este y antígeno Oeste ...	0	0	0	0	0	0	0
Control suero hiperinmune Oeste y antígeno Este ...	0	0	0	0	0	0	0
Control de antígeno virulento de cerebro de ratón al 1/4, sin suero problema	0	0	0	0	0	0	0
Control de antígeno de cerebro de ratón al 1/2 y 1/4.	0	0	0	0	0	0	0

4 = Fijación total.
0 = Hemolisis total.
3, 2, 1 ± = Grados intermedios de fijación.

Eliminados los posibles errores por la marcha perfecta de los controles (véase cuadro), resulta evidente, que todos los sueros estudiados, con la única excepción del número 4 de cinco días de enfermedad, poseían en mayor o menor proporción anticuerpos fijadores del complemento en presencia de los antígenos virulentos de las encefalitis equinas tipo Este y Oeste de América del Norte, siendo estas fijaciones más acusadas frente al primero de los antígenos.

Estos resultados son a nuestro juicio dignos de ser tomados en consideración, ya que un numeroso grupo de prestigiosos investigadores americanos (1) afirman, que la estructura antigénica en común para los virus equinos del Este y del Oeste, fundamentando tal afirmación en los resultados experimentales que resumen en dos de sus tablas. Posteriormente (1952), otro grupo de investigadores (U. Wisconsin, Madison) (2), después

de aislar el virus de la encefalomielitis equina Este de un caballo en Wisconsin Sur-Centro, encontraron en el suero de uno de los animales recuperados anticuerpos fijadores del complemento para ambos tipos de virus Este y Oeste.

Agradecemos a D. Emilio Ronda Laín la colaboración prestada en este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

(1) WATSON, D. W., HAVENS, W. P. Jr, GREEN, R. H., LAVIN, G. I. and SMADEL, J. E.—1943. **Jour Exp. Med.**, 77, 2, 139-153.

(2) HANSON, R. P., SCOTT, G. R., FERRIS, D. and UPTON, E.—1954. **Amer. Jour. Trop. Med. Hyg.**, 3, 1, 54-56.

BIBLIOGRAFIA

INDICE DE ARTICULOS DE REVISTAS

Bajo este epígrafe se efectúa la publicación sistemática, por orden cronológico, de los títulos de los trabajos que han aparecido en los últimos años en las principales revistas microbiológicas. En este número se recogen los títulos correspondientes al tomo 60 (1950) de **Journal of Bacteriology** (Biblioteca del Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.—I. E.).

Mediante convenio con el Servicio de Microfilm del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, **Microbiología Española** puede facilitar a los suscriptores reproducciones de los artículos que deseen, para lo cual bastará escribir a la Redacción de la Revista, Serrano, 113 ó 152, Madrid, precisando el número, en negrita, que encabeza el artículo cuya copia se solicita.

Los precios y condiciones se detallan al final de esta Sección.

3.590

PARKER HITCHENS (Arthur) (1877-1949).—1950. **Journal of Bacteriology.** 60: 1-3. I. E.

3.591

BEARDMORE (William B.) and **DODD (Matt C.)**.—1950. The growth of the reiter strain of treponema pallidum in the chick embryo. 1949. **Journal of Bacteriology.** 60: 5-7. I. E.

3.592

DeSPAIN SMITH (Louis) and **DOUGLAS (Howard C.)**.—1950. Factors necessary for maximum growth of clostridium bifermentans. **Journal of Bacteriology.** 60: 9-15. I. E.

3.593

DAVIS (Bernand D.) and MINGIOLI (Elizabeth S.). — 1950. Mutants of escherichia coli requiring methionine of vitamin B_{12}. **Journal of Bacteriology.** 60: 17-28. I. E.

3.594

KOERBER (Walter L.), GREENSPAN (George) and LANGLYKKE (A. F.).—1950. Observations on the multiplication of phages affecting streptomyces griseus. **Journal of Bacteriology.** 60: 29-37 I. E.

3.595

THOMA (Richard W.) and PETERSON (W. H.).—1950. Biotin and arginine replacements in the nutrition of clostridium sporogenes. **Journal of Bacteriology.** 60: 39-48. I. E.

3.596

KITAY (Estelle) and SNELL (Esmond E.).—1950. Some additional nutritional requirements of certain lactic acid bacteria. **Journal of Bacteriology.** 60: 49-56. I. E.

3.597

STEINMAN (Harry G.) and EAGLE (Harry).—1950. Nutritional requirements of treponemata. II.—Pantothenic acid, glutamine, and phenylalamine as additional growth-prometing factors for the reiter treponema. **Journal of Basteriology.** 60: 57-68. I. E.

3.598

RAFF (Ruth N.) and COHEN (Seymour R.).—1950. The effect of virus infection on the utilization of tryptophan by escherichia coli. **Journal of Bacteriology.** 60: 69-80. I. E.

3.599

STEMPEN (Henry).—1950. Demonstration of the chromatinic bodies of escherichia coli and proteus vulgaris with the aid of the phase contrast microscope. **Journal of Bacteriology.** 60: 81-87. I. E.

3.600

HOUSEWRIGHT (Riley D.) and THORNE (Curtis B.).—1950. Synthesis of glutamic acid and aglutamyl polypeptide by bacillus anthracis. I.—Formation of glutamic acid by transamination. **Journal of Bacteriology.** 60: 89-100. I. E.

3.601

SAPIRO (Raya) and HIRSCH (Willy).—1950. A new salmonella type: salmonella haifa. Journal of Bacteriology. 60: 101. I. E.

3.602

WILLIAMS (O. B.) and ENGLISH (Jack D.).—1950. Phenol production by coliform bacteria. **Journal of Bacteriology.** 60: 101-102. I. E.

3.603

WON (William D.).—1950. The production of «giant» cells of pasteurella pestis by treatment with camphor. **Journal of Bacteriology.** 60: 102-105. I. E.

3.604

CHRISTMAN (John F.) and LICHSTEIN (Herman C.).—1950. The relationship of biotin to the coenzyme of certain amino acid deaminases. **Journal of Bacteriology.** 60: 107-112. I. E.

3.605

SIEGEL (Benjamin V.) and CLIFTON (C. E.)—1950. Oxidative assimilition of glucose by escherichia coli. **Journal of Bacteriology.** 60: 113-118. I. E.

3.606

VAUGHN (Reese H.), OSBORNE (Joel T.), WEDDING (George T.) and TABACHNICK (Joseph).—1950. The utilization of citrate by escherichia coli. **Journal of Bacteriology.** 60: 119-127. I. E.

3.607

ANGULO (Juan J.), WATSON (John H. L.) and OLARTE (Jorge).—1950. Artifacts with other nonspecific appearance resembling virus particles, and the so-called filamentous forms of influenza and fowl pest viruses in human skin tissue fluid examined with the electron microscope. **Journal of Bacteriology.** 60: 129-138. I. E.

3.608

PRIER (J. E.) and ALBERTS (J. O.).—1950. The efects of penicillin against erysipelothrix rhusiopathiae in vitro and in vivo. **Journal of Bacteriology.** 60: 139-143. I. E.

3.609

PLOUGH (H. H.), YOUNG (Helen N.) and GRIMM (Madelon R.).—1950. Penicillin-screented auxotrophic mutations in salmonella typhimurium and their relation to X-Ray dosage. **Journal of Bacteriology.** 60: 145-157. I. E.

3.610

KLEIN (Morton), SCHORR (Sonia E.), TASHMAN (Sylvia) and HUNT (Andrew D.).—1950. Evaluation of oral, intravenous, and intramuscular aureomycin and the correlation between the in vivo and in vitro activity. **Journal of Bacteriology.** 60: 159-169. I. E.

3.611

WARREN (John R.) and GRAHAM (Fredrick).—1950. The effect of heparin on the growth of bacteria and Yeasts. **Journal of Bacteriology.** 60: 171-174. I. E.

3.612

SHAW (Myrtle) and DALLDORF (Gilbert).—1950. Investigations of the fecal bacteria of mice, with reference ot the presence of mouse encephalomyelitis virus. **Journal of Bacteriology.** 60: 175-183. I. E.

3.613

LEIN (Joseph) and LEIN (Patricia S.).—1950. The productions of acetate from fatty acids by neurospora. **Journal of Bacteriology.** 60: 185-190. I. E.

3.614

ZALOKAR (Marko).—1950. The sulfonamide-requiring mutant of neurospora: threonine-methionine antagonism. **Journal of Bacteriology.** 60: 191-203. I. E.

3.615

SCHMIDT (Clarence).—1950. Spore formation by thermophilic flat sour organisms. I.—The affect of nutrient concentration and the presence of salts. **Journal of Bacteriology.** 60: 205-212. I. E.

3.616

HIRSCH (W.), HENING (E.) and SAPIRO (R.).—1950. A new salmonella type: salmonella emek. **Journal of Bacteriology.** 60: 213- I. E.

3.617

WILLIAMS (Virginia R.) and ANDREWS (E. Anne).—1950. Turridimetric-titrimetric disparity in oleic acid stimulation of lactobacillus casei. **Journal of Bacteriology.** 60: 215-220. I. E.

3.618

EMERSON (Sterling).—1950. The growth phase in neurospora corresponding to the logarithmic phase in unicellular organisms. **Journal of Bacteriology.** 60: 221-223. I. E.

3.619

HENRIKSEN (Sverre Dick).—1950. A comparison of the phenylpyruvic acid reaction and the urease test in the differentiation of proteus from other enteric organisms. **Journal of Bacteriology.** 60: 225-231. I. E.

3.620

COWIE (Dean B.), BOLTON (Ellis T.) and SANDS (Margot K.).—1950. Sulfur metabolism in escherichia coli. I.—Sulfate metabolism of normal and mutant cells. **Journal of Bacteriology.** 60: 233-248. I. E.

3.621

MANDELS (G. R.) and SIU (R. G. H.).—1950. Rapid assay for growth: Determination of Microbiological susceptibility and fungistatic activity. **Journal of Bacteriology.** 60: 249-262. I. E.

3.622.

FRAM (Harvey), PROCTOR (Bernard E.) and DUNN (Cecil G.).—1950. Effects of-X-Rays produced at 50 kilovolts on different species of bacteria. **Journal of Bacteriology.** 60: 263-267. I. E.

3.623.

BAILEY (John Hays) and CAVALLITO (Chester J.)—1950. The effect of aliphatic acids on the activity of certain antibacterial agents. **Journal of Bacteriology.** 60: 269-274. I. E.

3.624.

MANDIA (James W.).—1950. The migration of cultures of clostridium perfrigens in semisolid medium. **Journal of Bacteriology.** 60: 275-277.

3.625

WARBASSE (Warren W.) and JOHNSON (Frank H.).—1950. The influence of penicilin on large body production by luminous bacteria. **Journal of Bacteriology.** 60: 279-282. I. E.

3.626

COLE (Leonard J.) and BRAUN (Werner).—1950. The effect of ionic Mn and Mg on the variation of brucella abortus. **Journal of Bacteriology.** 60: 283-289. I. E.

3.627

GOODLOW (Robert J.), MIKA (Leonard A.) and BRAUN (Werner).—1950. The effect of metabolites upon growth and variation of brucella abortus. **Journal of Bacteriology.** 60: 291-300. I. E.

3.628

SLADE (Hutton D.) and KNOX (Grace A.).—1950. Nutrition and the role of reducing agents in the formation of streptolysin o by a group a hemolytic streptococcus. **Journal of Bacteriology.** 60: 301-310. I. E.

3.629

BILLEN (Daniel) and LICHSTEIN (Herman C.). 1950. Nutritional requirements for hydrogenase production by escherichia coli. **Journal of Bacteriology.** 60: 311-314. I. E.

3.630

HUNTER (Mary Elizabeth), MUDD (Stuart) and WOODRURN (Marcia A.). 1950. The morphological characteristics of paired sulfon-amide-susceptible and sulfonamide-resistant strains of staphylococcus aureus. **Journal of Bacteriology.** 60: 315-320. I. E.

3.631

DeLAMATER (Edward D.).—1950. The nuclear cytology of the vegetative diplophase of saccharomyces cerevisiae. **Journal of Bacteriology.** 60: 321-332. I. E.

3.632

LEVINE (Seymour) and NOVAK (Milan).—1950. Studies on the metabolism of blastomyces dermatitidis. I. The effect of various substances on respiration. **Journal of Bacteriology.** 60: 333-340. I. E.

3.633

LEVINE (Seymour) and NOVAK (Milan).—1950. Studies on the metabolism of blastomyces dermatitis. II. The effect of pH respiration. **Journal of Bacteriology.** 60: 341-347. I. E.

3.634

KLINE (Leo) and BARKER (H. A.).—1950. A new growth factor required by butyribacterium rettgeri. **Journal of Bacteriology.** 60: 349-363. I. E.

3.635

BROUGH (Franklin K.).—1950. A rapid microtechnique for the determination of nitrate reduction by microorganisms. **Journal of Bacteriology.** 60: 365-366. I. E.

3.636

BRAUN (Werner) and HOWELL (E. Virgil).—1950. A simple method for the automatic separation of smooth bacterial types from mixed populations. **Journal of Bacteriology.** 60: 366-367. I. E.

3.637

EWING (William H.) and HUCKS (Martha C.).—1950. Two intermediate members of enterobacteriaceae. **Journal of Bacteriology.** 60: 367-368. I. E.

3.638

DAGLEY (S.) DAWES (E. A.) and MORRISON (G. A.).—1950. Inhibition of growth of aerobacter aerogenes: the mode of action of phenols, alcohols, acetone, and ethyl acetate. **Journal of Bacteriology.** 60: 369-379. I. E.

3.639

LEDERBERG (Joshua).—1950. The beta-D-galactosidase of escherichia coli, strain K-12. **Journal of Bacteriology.** 60: 381-392. I. E.

3.640

AJL (Samuel J).—1950. Metabolic studies on T2 escherichia coli, bacteriophage. **Journal of Bacteriology.** 60: 393-399. I. E.

3.641

ABELSON (Philip H.) and ALDOUS (Elaine).—1950. Ion antagonisms in microorganisms: interference of normal, magnesium metabolism by nickel, cobalt, cadmium, zinc, end manganese. **Journal of Bacteriology.** 60: 401-413. I. E.

3.642

KLIGMAN (Albert M.) and MESCON (Herbert).—1950. The periodic-acid-schiff stain for the demonstration of fungi in animal tissue. **Journal of Bacteriology.** 60: 415-421. I. E.

3.643

KNAYSI (Georges), HILLIER (James) and FABRICANT (Cahterine).—1950. The cytology of an avian strain of mycobacterium tuberculosis studied with the electron and light microscopes. **Journal of Bacteriology** 60: 423-447. I. E.

3.644

O'KANE (D. J.).—1950. Influence of the pyruvate oxidation factor on the oxidative metabolism of glucose by streptococcus faecalis. **Journal of Bacteriology.** 60: 449-458. I. E.

3.645

GERHARDT (Philipp), LEVINE (H. B.) and WILSON (J. B.).—1950. The oxidative dissimiliation of amino acids and related compounds by brucella abortus. **Journal of Bacteriology.** 60: 459-467. I. E.

3.646

KIMLER (Alexander).—1950. The in vitro effect of analogs of vitamin K on mycobacterium tuberculosis var hominis, strain H37Rv. **Journal of Bacteriology.** 60: 469-472. I. E.

3.647

THOMPSON (Frederick A.) jr. GREENBERG (Bernard G.) and MAGNUSON (Harold J.).—1950. The relationship between immobilizing and spirocheticidal antibodies against treponema pallidum. **Journal of Bacteriology.** 60: 473-480. I. E.

3.648

EVANS (James B.) BUETTNER (L. G.) and NIVEN (C. F.) jr.—1950. Evaluation of the coagulase test in the study of staphylococci associated with food poisoning. **Journal of Bacteriology.** 60: 481-484. I. E.

3.649

LICHSTEIN (Herman C.).—1950. Further studies on the biotin coenzyme. **Journal of Bacteriology.** 60: 485-487. I. E.

3.650

SUGG (John Y.).—1950. The relation of the concentration of unadapted and adapted influenza virus in the mouse lung to the death or survival of the infected host. **Journal of Bacteriology.** 60: 489-497. I. E.

3.651

LAMANNA (Carl) and MALLETTE (M. F.).—1950. The relation of the gram stain to the cell wall and the ribonucleic acid content of the cell. **Journal of Bacteriology.** 60: 499-505. I. E.

3.652

DAVIS (Bernard D.).—1950. Nonfiltrability of the agents of genetic recombination in escherichia coli. **Journal of Bacteriology.** 60: 507-508. I. E.

3.653

LEVINE (H. B.) and GARBER (E. D.).—1950. Detection of rough dissociants of pasteurella pestis with tetrazolium chloride. **Journal of Bacteriology.** 60: 508. I. E.

3.654

RITTENBERG (Sydney C.) and GRADY (Robert P.).—1950. Induced mutants of thiobacillus thiooxidans requiring organic growth factors. **Journal of Bacteriology.** 60: 509-510. I. E.

3.655

LABAW (Louis W.), MOSLEY (M.) and WYCKOFF (Ralph W. G.).—1950. Radioactive studies of the phosphorus metabolism of T2r+ bacteriophage with escherichia coli. **Journal of Bacteriology.** 60: 511-524. I. E.

3.656

EISENSTARK (A.), WARD (C. B.) jr. and KYLE (T. S.).—1950. A study of large bodies in azotobacter agile. **Journal of Bacteriology.** 60: 525-531.

3.657

COLLINS (E. B.), NELSON (F. E.) and PARMELEE (C. E.).—1950. The relation of calcium and other constituents of a defined medium to proliferation of lactic streptococcus bacteriophage. **Journal of Bacteriology.** 60: 533-542. I.E.

3.658

HARRISON (Arthur P.) jr. and HANSEN (P. Arne).—1950. Lactobacilli from turkeys. **Journal of Bacteriology.** 60: 543-555. I. E.

3.659

HANSON (R. P.), WINSLOW (Nancy S.), BRANDLY (C. A.) and UPTON (Elizabeth).—1950. The antiviral activity of newcastle disease immune sera **Journal of Bacteriology.** 60: 557-560. I. E.

3.660

YOUMANS (Anne Stewart) and YOUMANS (Guy P.).—1950. The effect of bovine plasma fractions on the growth of mycobacterium tuberculosis var. hominis. **Journal of Bacteriology.** 60: 561-568. I. E.

3.661

YOUMANS (Guy P.) and YOUMANS (Anne Stewart).—1950. The growth of recently isolated strains of mycobacterium tuberculosis var. hominis in liquid media. **Journal of Bacteriology.** 60: 569-572. I. E.

3.662

SIEGEL (Benjamín V.) and CLIFTON (C. E.).—1950. Energy relationships in carbohydrate assimilation by escherichia coli. **Journal of Bacteriology.** 60: 573-583. I. E.

3.663

SIEGEL (Benjamín) and CLIFTON (C. E.).—1950. Energetics and assimilation in the combustion of carbon compounds by escherichia coli. **Journal of Bacteriology.** 60: 585-593. I. E.

3.664

SIEGEL (Jack M.).—1950. The metabolism of acetone by the photosynthetic bacterium rhodopseudomonas gelatinosa. **Journal of Bacteriology.** 60: 595-606. I. E.

3.665

KALLIO (R. E.) and PORTER (J. R.).—1950. The metabolism of cystine and cysteine by proteus vulgaris and proteus morganii. **Journal of Bacteriology.** 60: 607-615. I. E.

3.666

LOFGREN (Ruth).—1950. The structure of leishmantia tropica as revealed by phase and electron microscopy. **Journal of Bacteriology.** 60: 617-625. I. E.

3.667

RANDLES (Chester I.).—1950. The oxidation of fatty acids by neisseria catarrhalis. **Journal of Bacteriology.** 60: 627-634. I. E.

3.668

MUDD (Stuart), SMITH (Andrew G.), HILLIER (James) and BEUTNER (Ernst H.).—1950. Electron and light mncroscopic studies of bacterial nuclei. III. The nuclear sites in metal-shadowed cells of Escherichia coli. **Journal of Bacteriology.** 60: 635-639.

3.669

HILLIER (James), MUDD (Stuart), SMITH (Andrew G.) and BEUTNER (Ernst H.).—1950. The «fixation» of electron microscopic specimens by the electron beam. **Journal of Bacteriology.** 60: 641-654. I. E.

3.670

SCHUHARDT (V. T.), RODE (L. J.), OGLESBY (Glenda) and LANKFORD (C. E.).—1950. The development of peptone toxicity for brucellae with aging and the correlation of this toxicity with the probable oxidation of cystine. **Journal of Bacteriology.** 60: 655-660. I. E.

3.671

RODE (L. J.), OGLESBY (Glenda) and SCHUHARDT (V. T.).—1950. The cultivation of brucellae on chemically defined media. **Journal of Bacteriology.** 60: 661-668. I. E.

3.672

STARR (Mortimer P.) and MANDEL (Manley).—1950. The nutrition of phytopathogenic bacteria. IV. Minimal Nutritive requirements of the genus erwinia. **Journal of Bacteriology.** 60: 669-672. I. E.

3.673

BROWN (Albert L.).—1950. A survey of nuclease production by streptococci. **Journal of Bacteriology.** 60: 673-675. I. E.

3.674

SHUMAN (R. D.) and LEE (A. M.).—1950. The susceptibility of hamsters to erysipelothrix rhusiopathiae. **Journal of Bacteriology.** 60: 677-678. I. E.

3.675

LEIFSON (Einar).—1950. The flagellation of spirochetes. **Journal of Bacteriology.** 60: 678-679. I. E.

3.676

NORRIS (Robert F.), FLANDERS (Thelma), TOMARELLI (R. M.) and GYORGY (Paul).—1950. The isolation and cultivation of lactobacillus bifidus: a comparison of branched and unbranched strains. **Journal of Bacteriology.** 60: 681-696. I. E.

3.677

WATSON (James Dewey).—1950. The Properties of X-ray-inactivated bacteriophage. I. inactivation by direct-effect. **Journal of Bacteriology.** 60:697-718. I. E.

3.678

JAMES (A. P.).—1950. The development of tyrosine-independent strains of lactobacillus arabinosus. **Journal of Bacteriology.** 60: 719-731. I. E.

3.679

MAAS (Werner K.) and DAVIS (Bernard D.).—-950. Pantothenate studies I. Interference by d-serine and l-aspartic acid with pantothenate synthesis in escherichia coli. **Journal of Bacteriology.** 60: 733-745. I. E.

3.680

SISLER (Frederick D). and ZOBELL (Claude E.).—1950. Hydrogen-utilizing, sulfate-reducing bacteria in marine sediments. **Journal of Bacteriology.** 60: 747-756.

3.681

MOAT (A. G. and DELWICHE (Eugene A.).—1950. Utilization of coenzyme a by propionibacterium freudenreichii. **Journal of Bacteriology.** 60: 757-762. I. E.

3.682

KUTSKY (R. J.) and RAWLINS (T. E.).—1950. Inhibition of virus multiplication by naphthalener acetic acid in tobacco tissue cultures as revealed by a spectrophotometric method. **Journal of Bacteriology.** 60: 763-766. I. E.

3.683

BERNHEIM (Frederick).—1950. The sarcosine oxidase in adapted and unadapted cultures of a strain of pseudomonas aeruginosa. **Journal of Bacteriology.** 60: 767-770. I. E.

3.684

ZOBELL (Claude E.) and OPPENHEIMER (Carl H.).—1950. Some effects of hydrostatic pressure on the multiplication and morphology of marine bacteria. **Journal of Bacteriology.** 60: 771-781. I. E.

Fotocopias en microfilm.

Microfilm negativo, cada fotograma (24 × 36 mm.), 1 peseta.

Microfilm positivo (indicando cuando hoy fotograbados), cada fotograma, 2 pesetas.

Carpeta «Filmoteca» para diez filmofichas, 2 pesetas.

Mínimo pagable en todo encargo: el valor de una filmoficha, 5 pesetas en negativo y 10 pesetas en positivo.

A partir de 1.000 fotogramas, precios especiales por convenir.

Opciones que se presentan: en negativo o en positivo; en rollo continuo o en filmofichas; con carpeta «Filmoteca» o filmofichas sueltas; metiendo en cada fotograma dos páginas o sólo una.

Salvo aviso en contrario se servirán los encargos en microfilm negativo, en filmofichas y en carpetas, y el meter una o dos páginas por fotograma se supondrá se deja al discernimiento del Servicio, según sea el original.

La modalidad «filmoficha, por la gran facilidad de ordenación, localización rápida de las cintas y manejo de lectura, supera con mucho a la modalidad en rollo. Se llama «filmoficha» una tira de película de cinco fotogramas y medio (en otros sistemas seis), en que caben diez páginas de libro ordinario (libro abierto, o sea dos páginas cada foto). El medio fotograma que se añade (uno entero en otros sistemas) se destina a «referencia», es decir, autor, título y signatura en la filmoteca y en el centro de origen. Las filmofichas, para ofrecer tales ventajas, van alojadas en unas carpetas «Filmoteca» especialmente dispuestas para contener diez de ellas (cien páginas o cincuenta folios) en lóculos perfectamente adaptados, con sus referencias numéricas y espacio preciso para títulos, páginas y toda clase de indicaciones útiles.

Fotocopias en papel.

Formato: 9 × 12 cm.: en mate, 3 pts.; con brillo, 3,75 pts.
» 13 × 18 cm.: en mate, 4 pts.; con brillo, 5,25 pts.
» 18 × 24 cm.: en mate, 6 pts.; con brillo, 8,25 pts.
» 21 × 30 cm.: en mate, 6,25 pts.
» 30 × 42 cm.: en mate, 9,25 pts.

N. B. Estos precios están sujetos a cierta variación, según vengan facturadas las partidas de papel.

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA»

ANALES DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL.—Publicados por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.

Continuadores de los «Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal». Abiertos a una amplia colaboración, recogen en sus páginas trabajos sobre suelos y fisiología vegetal, tanto del Instituto de origen como de otros Centros investigadores españoles y extranjeros y, asimismo, estudios de tipo informativo y bibliográfico.

Mensual. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 160 pesetas.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI».—Revista dedicada a la publicación de trabajos originales sobre investigación agrícola y problemas biológicos relacionados con la misma. Publicada por la Estación Experimental de «Aula Dei», Zaragoza.

Cada volumen, excepto Vol. 1, contiene unas 300 páginas, distribuídas en cuatro números, que se publican a intervalos irregulares.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES».—Publicación del Instituto «Antonio J. de Cavanilles».

Publica trabajos y notas científicas que abarcan todos los campos de la Botánica.

Precio del tomo anual, 100 pesetas.

COLLECTANEA BOTANICA.—Publicación del Instituto Botánico de Barcelona.

Dedicado a la Botánica en general, viene a ser un órgano exterior de la actividad del Instituto Botánico de Barcelona, elemento de enlace con los demás Centros de investigación.

Publica trabajos sobre las distintas disciplinas de la Botánica: Sistemática, Florística, Fitosociología, Fisiología, Micología, Briología, Algología, etc.

Dedica una parte a reseñas bibliográficas y a la información.

Semestral. Ejemplar, 30 pesetas. Suscripción, 45 pesetas.

FARMACOGNOSIA.—Publicación del Instituto «José Celestino Mutis».

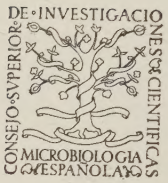
Esta revista está dedicada al estudio de los problemas de la Farmacognosia, siendo sus finalidades: una, propiamente científica, que trata de Botánica, análisis químico, experimentación fisiológica y clínica, y otra, de orden práctico, relativa al cultivo y recolección de materias primas idóneas, no sólo para la Medicina, sino para la Dietética y la Industria.

Trimestral. Ejemplar, 25 pesetas. Suscripción, 80 pesetas.

GENETICA IBERICA.—Publicación del Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis».

Publica trabajos sobre Citología, Citogenética y Genética de los diversos materiales que constituyen el tema específico de investigación en los distintos Centros colaboradores de la revista, en España y Portugal, y los relacionados con la mejora de las especies vegetales que interesan a la Farmacognosia.

Trimestral. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 70 pesetas.


CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA